

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Departamento de Química-Física Aplicada



**ESPECTROSCOPIA RAMAN INTENSIFICADA POR
SUPERFICIE DE BIOMOLÉCULAS A TRAVÉS DE
NANOPARTÍCULAS PLASMÓNICAS ULTRASENSIBLES**

Memoria para optar al grado de Doctor
Presentada por:

Adianez García Leis

Director:

Dr. Santiago Sánchez Cortés

Instituto de Estructura de la Materia
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS



Madrid, 2015

“Después de escalar una gran colina,
uno se encuentra sólo con que hay muchas más colinas que escalar”.

Nelson Mandela

A mis dos grandes amores (Carlos y Josué), a mi familia y en especial a ti, mima!

Agradecimientos

*Si ya estoy escribiendo estas líneas es porque el trabajo más difícil ya está terminado. Para lograr un buen resultado final se necesita el apoyo y la ayuda de muchas personas y no se puede resumir en la palabra **Agradecimientos** toda la gratitud y la retribución que se merecen aquellos que, de una forma u otra, han participado en la realización de este trabajo. Estas primeras líneas se las dedico a la persona que, aún sin conocerme, confió en mí y me abrió las puertas de este maravilloso mundo de la investigación allá por el año 2009 (hace ya mucho tiempo de esto). Muchas gracias Santiago por tu paciencia infinita con cada una de las dudas y dificultades que surgieron a lo largo de estos años. Por los consejos que con tanta sabiduría me has dado, por el apoyo y la confianza que me has transmitido siempre. Porque es muy reconfortante encontrarse a personas como tú en el trayecto que decides recorrer cuando tomas la decisión de enfrentarte a un reto de tal magnitud y complicación, sumado al hecho de que estás fuera de tu ambiente, de tu país y de tu familia, tú me has hecho las cosas más fáciles y agradables, una y mil veces **Gracias**.*

Como no podía ser de otra manera, le agradezco a Sagrario el apoyo y los consejos que me ha brindado con tanto cariño. Por esas charlas que siempre terminan en los temas habituales: los hijos, la familia y la vida. A José Vicente le agradezco esa alegría con la que siempre me habla de mi Cubita la bella, por esa añoranza de regresar una vez más y que me hace recordar siempre a los “míos”. A José Antonio, por el entusiasmo con el que siempre convoca a las cañas de los viernes y por esas nanoestrellas de magníficos plasmones. Luis Díaz, siempre tan pendiente de la literatura, la música y el cine cubano. Gracias a Concha, Paz y M^a Vega por sus buenos consejos. Gracias Alessandro por tu amistad y por las conversaciones que tuvimos en el ya conocido como despacho internacional (237), junto a Lorena. Y Juanita, con esa vitalidad que la caracteriza, siempre pendiente de todo. Muchas gracias Dolores, por aceptar ser mi tutora en la UAM y estar siempre al tanto de mis cosas, seguro que no hay muchos tutores como tú.

Muchas gracias a la larga lista de compis becarios con los que he compartido maravillosos momentos durante estos años, empezando por las chicas que me precedieron y fueron las que me abrieron las puertas del labo, e hicieron que el Renishaw fuera user-friendly para mí, la Rachel y Elena (inauguradoras además de nuestro querido club del tupper) e Irene, compañera y amiga de tertulias en el té, en el baile (de salsa, como no podía ser de otra manera) y en la ciencia. Gracias Monchi, por permitir que te llamara así durante todos estos años y no molestarte conmigo (a pesar de que siempre dejaste claro que no te gustaba ese mote), a Rogelio por ese mi amol desde el primer día que llegué al Instituto. Gracias Elisa, por tu amistad incondicional cuando lo necesité y por estar siempre pendiente de Carlitos, te extraño compi! A la Tronca (Janka) por todos los paseos que nos dimos del CSIC a Nuevos Ministerios después de las intensas jornadas de laboratorio e InVia. A Fernando, Luis Froufe, Leo, Chiara, Francesca, Laura B., Rafa, María Sole y Teresa, algunos de estancias más largas que otros, pero todos presentes. A Edu, por ser tan amable y estar siempre dispuesto a ayudarte en lo que necesites. A Marga, Diego, Rocío, Moisés, gracias por seguir todavía aquí. Quiero darle las gracias también a la otra parte del club del tupper, a Roberta, Antonio, Dani y Santi por las tantas comidas y sobremesas que hicimos juntos. A Irene (Rivera) por demostrarme que el mundo es un pañuelo y que siempre hay tiempo para hacer algo más. Y un agradecimiento especial para Zuzka y Laura, que a pesar de ser las últimas en

llegar (en el momento más complicado, que es el final), lo han hecho para quedarse y así poder disfrutar de esa amistad y valía.

Gracias al Fondo Social Europeo y al Programa JAE-Pre del CSIC que me dieron la oportunidad de hacer una estancia breve de dos meses en Italia donde pude conocer a la gran Donna Armida! Grazie per tutto. Le agradezco también al Dr. Pavol, a Dano, Jarka y Lucía todas las atenciones que tuvieron conmigo cuando lo necesité en Kosice.

Muchas gracias a ese Grupo de Cubanos en España con el que de una forma u otra, cuando nos reunimos, me hacen sentir como en casa: Marante, Roger, Javier, Aimee, Yani (aunque te hayas ido al país de los malos, y que ahora son buenos...jejeje). A Erney, que siempre está ahí para tomar un café, en la comida, para chismear de las cosas de allá y para dar chucho! A mi vecina Aylin (que el monopoly es solo un juego, pero nos lo tomamos muy en serio...jejeje) y a Chuchi, siempre disponible para lo que sea, gracias chic@s por ser incondicionales.

A mi familia, que es imposible escribir estas líneas sin que se nuble la vista por la presencia de una lágrima indiscreta que me hace recordar los kilómetros que nos separan. Mami, papi, muchas gracias por apoyarme en todas mis decisiones, por dejarme recorrer, sin obstáculos, el camino que he escogido y por saber sobrellevar los embates de la lejanía. A todos mis hermanos, que aunque estemos dispersos por el mundo, seguimos muy unidos. A mis niñas (Adriana y Ariadna), por cuidar de mamá. A mi tía por ser incondicional y estar siempre ahí, por los consejos y apoyo de toda la vida, y a mis primos por supuesto (Anette te me has hecho grande entre las manos). A mis viejos, por ser tan fuertes. Mima, qué más quisiera yo que algún día, aunque sea por un instante, recobraras tu memoria para poderte agradecer una vez más todos los sacrificios que has hecho por nosotros, eres grande y eso nunca lo olvidaré! Suegri, gracias por esa energía positiva que viaja desde la distancia y que traspasa mares, océanos y montañas para ayudarme a ser más fuerte cada día.

Y qué decir de ti, mi Josué, GRACIAS infinitas por permitirme recorrer la vida a tu lado. Por ser el pilar que sostiene mis emociones. Por estar a mi lado en las verdes y en las maduras y por saber sacar lo mejor de mí. ¿Qué hubiera sido de mí si no te hubiera conocido? Gracias por tu incondicionalidad y por ayudarme a formar la familia que hoy disfrutamos.

Gracias a la vida, que me ha dado tanto!!!

ÍNDICE

1. Introducción.....	3
2. Antecedentes.....	3
2.1 FUNDAMENTOS DE LA ESPECTROSCOPÍA VIBRACIONAL RAMAN	7
2.1.1 Breve descripción del efecto Raman	7
2.2 ESPECTROSCOPÍA RAMAN INTENSIFICADA POR SUPERFICIE.....	10
2.2.1 Propiedades ópticas de las nanoestructuras metálicas	10
2.2.2 Plasmones localizados en estructuras metálicas de diferentes formas y tamaños	11
2.3 REGLAS DE SELECCIÓN.....	12
2.3.1 Mecanismo Electromagnético	13
2.3.2 Mecanismo de Transferencia de Carga.....	17
2.4 SOPORTES PARA ESPECTROSCOPÍA SERS.....	20
2.4.1 Películas de partículas metálicas aisladas	21
2.4.2 Electrodo metálico de superficie rugosa	21
2.4.3 Nanoestructuras obtenidas mediante litografía sobre una superficie.....	22
2.4.4 Suspensión de nanopartículas o coloides metálicos	22
2.4.4.1 Nanopartículas con forma de estrella.....	24
2.4.4.2 Nanoestrellas huecas	25
2.5 PROPIEDADES SUPERFICIALES DE COLOIDES DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS	26
2.6 ADSORCIÓN MOLECULAR SOBRE SUPERFICIES.....	29
2.6.1 Modelos de adsorción	30
2.7 APLICACIÓN DE LA TÉCNICA SERS AL ESTUDIO DE BIOMOLÉCULAS	33
2.7.1 Colorantes histológicos marcadores de agregados amiloideos.....	35
2.7.2 Péptidos fibrogénicos.....	37
2.7.3 Péptidos formadores de agregados amiloideos.....	39
3. Objetivos	41
3.1 OBJETIVO GENERAL	43
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	43
4. Parte Experimental.....	27
4.1 MATERIALES	47
4.2 INSTRUMENTACIÓN.....	48

4.3 MÉTODOS	50
4.3.1 Fabricación de nanoestrellas de plata con propiedades plasmónicas.....	50
4.3.2 Fabricación de nanoestrellas bimetálicas huecas con propiedades plasmónicas	51
4.3.3 Preparación de muestras y registro de medidas.....	53
4.3.4 Análisis por Componentes Principales	56
4.3.5 Isotermas de adsorción.....	56
4.3.5.1 Límite de detección.....	58
5. Resultados y Discusión	61
5.1 CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS FABRICADAS EN ESTE TRABAJO	63
5.1.1 Caracterización de coloides metálicos de nanopartículas esféricas.....	63
5.1.2 Caracterización de coloides metálicos de nanopartículas con forma de estrella	65
5.1.3 Clasificación de las nanoestrellas de plata teniendo en cuenta su morfología mediante el estudio por PCA	75
5.1.4 Factor de intensificación SERS de las nanoestrellas	78
5.1.5 Caracterización mediante SERS de la composición química de la corteza de las nanoestrellas huecas bimetálicas.....	84
5.2 ESTUDIO DE SUSTANCIAS MARCADORAS BIOLÓGICAS: ADSORCIÓN SOBRE NANOPARTÍCULAS Y ESPECTROS SERS.....	87
5.2.1 SERS de las sustancias marcadoras biológicas	87
5.2.2 Análisis cuantitativo y detección de las moléculas marcadoras biológicas mediante SERS	90
5.3 ADSORCIÓN DE PÉPTIDOS FIBROGÉNICOS SOBRE NANOPARTÍCULAS PLASMÓNICAS	94
5.3.1 Adsorción del péptido Lanreótido sobre NPs metálicas	96
5.3.2 Análisis de la adsorción del péptido Pasireótido (SOM230) sobre nanopartículas plasmónicas	108
5.3.3 Adsorción del β -Amiloide y sus fragmentos sobre nanopartículas plasmónicas: Efecto sobre la fibrilación.....	119
6. Conclusions	131
7. Bibliografía.....	137
8. Summary	157
9. Publicaciones	163

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

FIGURAS

- Figura 2.1:** Diagrama de niveles de energía con la representación de las tres formas de dispersión de la radiación electromagnética. La energía de la radiación incidente ($h\nu_0$) es igual a la de la radiación emitida en la dispersión Rayleigh, menor ($h(\nu_0-\nu_{int})$) en la Stokes y mayor ($h(\nu_0+\nu_{int})$) en la anti-Stokes.....8
- Figura 2.2:** (A) Representación esquemática de los modos SPP en la interfase metal-dieléctrico. (B) Plasmones de superficie localizados en una nanopartícula de diámetro D. 11
- Figura 2.3:** Proceso de dispersión Raman en ausencia (a) y presencia (b) de una nanopartícula metálica 14
- Figura 2.4:** Esquema del mecanismo de transferencia de carga que ocurre entre el metal y la molécula en el efecto SERS. TC: metal a molécula $E_f \rightarrow$ LUMO (a) y TC: molécula a metal $HOMO \rightarrow E_f$ (b). 18
- Figura 2.5:** (a) Distribución de iones sobre la superficie de la nanopartícula metálica y curva de potencial eléctrico (Ψ) en función de la distancia a la superficie (Ψ_0 es el potencial eléctrico en la superficie metálica y ζ es el potencial zeta en la capa de Stern. (b) Fuerzas de atracción y repulsión entre nanopartículas (teoría DVLO) [105].27
- Figura 2.6:** Modelos de adsorción de moléculas en una superficie: (a) adsorción de una monocapa sobre la superficie (tipo Langmuir) y (b) adsorción en multicapas sobre la superficie (tipo B.E.T.).....30
- Figura 2.7:** Tipos de isothermas de adsorción del adsorbato sobre una superficie. I-isoterma de Langmuir y II-isoterma de BET para diferentes tipos de interacción adsorbato-superficie diferente a Langmuir. [A]-concentración del adsorbato y θ -fracción de recubrimiento.....32
- Figura 2.8:** Estructura química de las moléculas de: a) Rojo Congo y b) tioflavina T con un ángulo de torsión (ϕ) entre las mitades benzotiazol y amino-benceno (“rotor molecular”)......36
- Figura 2.9:** Estructura química de los péptidos estudiados: Lanreótido (a) y Pasireótido (b).38
- Figura 2.10:** (a) Secuencia de los aminoácidos en código de una letra del péptido β -Amilode. Estructura tridimensional obtenida de la RCSB Protein Data Bank para los tres fragmentos de β -Amilode utilizados y visualizadas con GaussView 5.0: (b) βAm_{1-42} [162], (c) βAm_{1-40} [163] y (d) βAm_{25-35} [164].39
- Figura 4.1:** Espectrofotómetro Raman Renishaw InVia (a). Equipo CytoViva (Auburn, AL), compuesto por un microscopio Olympus de campo oscuro intensificado (EDFM) que tiene acoplado por vía de un dispositivo de fibra óptica para obtener imágenes hiperespectrales en el rango VNIR (400-1000 nm) (b).48
- Figura 4.2:** (a-c) Esquema propuesto para la formación de las NSH partiendo de las NSAg utilizadas como semilla de crecimiento, deducido a partir de las imágenes TEM realizadas para su caracterización. (d-g) Esquema propuesto para el reemplazamiento galvánico y formación de la aleación Ag/Au que ocurre en la superficie de las nanoestrellas.52
- Figura 5.1:** A) Espectros de extinción de coloides de NPs esféricas: AuCT (a), AgHxCl (b) y AgCT (c). B) Imágenes TEM de los coloides AuCT (a), AgHxCl (b) y AgCT (c).64

Figura 5.2: Espectros de extinción de las nanopartículas NSAg bajo diferentes condiciones de reacción: NSAg1 (rojo); NSAg2 (verde); NSAg3 (azul); NSAg4 (celeste); NSAg5 (rosa); NSAg6 (morado); NSAg7 (mostaza) y NSAg8 (naranja) preparadas empleando diferentes tiempos (T_1) entre la primera reducción con Hx y la segunda con CT: A) 5 minutos; B) 30 minutos y C) 60 minutos. Todos los espectros de extinción fueron tomados a las 24h de fabricados los coloides. Todos los espectros están normalizados al máximo de extinción presente para cada espectro.65

Figura 5.3: Imágenes TEM de las diferentes muestras de nanopartículas a $T_1=5$ minutos: a) NSAg105; b) NSAg205; c) NSAg305; d) NSAg405; e) NSAg505; f) NSAg605; g) NSAg705 y h) NSAg805.....66

Figura 5.4: Imágenes TEM de las diferentes muestras de nanopartículas a $T_1=30$ minutos: a) NSAg130; b) NSAg230; c) NSAg330; d) NSAg430; e) NSAg530; f) NSAg630; g) NSAg730 y h) NSAg830.....67

Figura 5.5: Imágenes TEM de las diferentes muestras de nanopartículas a $T_1=60$ minutos: a) NSAg160; b) NSAg260; c) NSAg360; d) NSAg460; e) NSAg560; f) NSAg660; g) NSAg760 y h) NSAg860.....67

Figura 5.6: A) Esquema de una nanoestrella señalizando las variables evaluadas para la caracterización morfológica: a -longitud del brazo, d -diámetro de la NP y b -anchura de la punta. B) Esquema del mecanismo de formación y crecimiento de las nanopartículas NSAg propuesto en esta tesis, deducido a partir de las imágenes TEM obtenidas a partir del proceso de formación. Las NPs I-III muestran un aspecto facetado resultante de la acción reductora de Hx. Las NPs IV y V fueron registradas a las 24h y 48h de reducción con citrato, respectivamente..68

Figura 5.7: Imágenes obtenidas mediante microscopía de campo oscuro ($35\mu\text{m} \times 35\mu\text{m}$) de las muestras NSAg105; NSAg705; NSAg305; NSAg360 y AgHxC1 (A). Espectros de dispersión más frecuentes en las muestras medidas a partir de las imágenes obtenidas por DFM (B). Mapa de las imágenes obtenidas por DF utilizando los espectros de emisión más frecuentes del área analizada (C). Distribución de las NP metálicas analizando la distribución de color obtenida por los espectros de emisión más frecuentes (D). Imágenes TEM (E) de las muestras NSAg305; NSAg705; NSAg105; NSAg360 y AgHxC1.70

Figura 5.8: Espectro EDX (*Spectrum 1*) de la muestra NSAg305 (a) e imagen de la zona de la muestra donde se efectuó la medida EDX (b).72

Figura 5.9: Espectros de extinción de coloides de nanoestrellas huecas: NSAgAu1 (a); NSAgAu2 (b); NSAgAu3 (c) y AuNP (d). Micrografías TEM de NSAgAu1 (e); NSAgAu2 (f); NSAgAu3 (g) y AuNP (h). La barra de escala corresponde a 100 nm.73

Figura 5.10: Imágenes obtenidas mediante microscopía de campo oscuro ($35\mu\text{m} \times 35\mu\text{m}$) de las muestras NSAgAu1, NSAgAu3 y AuNP (A). Espectros de difusión o scattering más frecuentes en las muestras medidas a partir de las imágenes obtenidas por DF (B). Mapa de las imágenes obtenidas por DF utilizando los espectros de difusión más frecuentes del área analizada (C). Distribución de las NP metálicas analizando la distribución de color obtenida por los espectros de difusión más frecuentes (D). Imágenes TEM (E) de las muestras NSAgAu1, NSAgAu3 y AuNP.....75

Figura 5.11: Gráfico Bi-plot de los *Scores* y *Loadings* de los dos primeros componentes principales mediante PCA de las nanoestrellas de plata fabricadas teniendo en cuenta las variables morfológicas analizadas. La barra de escala corresponde a 100 nm.76

Figura 5.12: Fórmula química de las moléculas de prueba: a) tiofenol y b) tioflavina T78

Figura 5.13: Espectros SERS del TP (1 μ M) empleando las nanoestrellas fabricadas como sustrato a los diferentes T_1 : 5 minutos (a), 30 minutos (b) y 60 minutos (c). *Banda que pertenece al etanol utilizado como disolvente del TP. Excitación a 532 nm.....80

Figura 5.14: Espectro Raman de ThT 10 mM en disolución acuosa (a) y espectros SERS de ThT 1 μ M sobre los coloides NSAgAu2 (b) y AuCT (c), excitación a 785 nm. (d) Intensidad SERS de ThT en dependencia de la longitud de onda de excitación y del coloide empleado. Estas intensidades se midieron utilizando líneas láser a 785 (barras rojas) y 532 nm (barras verdes). NSAgAu1, NSAgAu2, NSAgAu3, AuNP y AuCT corresponden a las muestras de la tabla 4.2.....82

Figura 5.15: Espectros SERS de ThT (1 μ M) a diferentes longitudes de onda de excitación: 532 nm (a) y (f), a 785 nm (b) y (g) sobre los sustratos NSAgAu1 y NSAgAu3 respectivamente. Espectros de extinción de las muestras NSAgAu1 (c) y NSAgAu3 (d). Espectro de absorción de ThT (10 mM) en agua (e).....83

Figura 5.16: Espectros SERS de la lucigenina en la región espectral a bajo número de ondas donde se ve reflejada la banda de interacción Metal-Cl⁻. *Insertado:* Estructura química de la lucigenina y la dependencia de la posición de la banda $\nu(\text{Metal-Cl}^-)$ en los espectros SERS utilizando diferentes NPs; excitación a 785 nm. Los espectros se obtuvieron realizando dos barridos a 10 s de tiempo de integración cada uno, con una potencia del láser de 0.5 mW.85

Figura 5.17: Espectro EDX (*Spectrum 1*) de la muestra NSAgAu3 (a) e imagen de la zona de la muestra donde se efectuó la medida EDX (b)86

Figura 5.18: Estructuras moleculares y numeración de los átomos de los colorantes histológicos marcadores de agregados de β -Amiloide: Rojo Congo (a) y tioflavina T (b).87

Figura 5.19: Espectros FT-Raman y SERS de los colorantes histológicos: Rojo Congo (A) y tioflavina T (B). Espectros FT-Raman del sólido (a) y en solución acuosa 10 mM (b), para ambas moléculas respectivamente. Espectros SERS a 532 nm de excitación utilizando diferentes sustratos: NSAg305 (c), NSAgAu3 (d) y AgHxC1 (e), para ambos colorantes respectivamente. En todos los experimentos SERS la concentración de ThT fue de 1 μ M, menos para el caso de la ThT en presencia de NSAg305 (espectro c del gráfico B) que fue de 10 μ M.....88

Figura 5.20: Representación de la intensidad SERS frente a la concentración de adsorbato y ajuste realizado para los datos experimentales SERS para: Rojo Congo sobre NSAg305 (a) y tioflavina T sobre NSAgAu3 (b). *Insertado:* Posible mecanismo de adsorción sobre la superficie metálica propuesto a partir del análisis de los espectros SERS. Excitación a 532 nm.....91

Figura 5.21: Recta de calibrado donde se representa I_{SERS} frente a la concentración de analito: Rojo Congo sobre NSAg305, (5×10^{-9} - 10^{-7} M) (a) y tioflavina T sobre NSAgAu3 (7×10^{-7} - 10^{-5} M) (b). Excitación a 532 nm.....93

Figura 5.22: Estructura química de los péptidos estudiados: Lanreótido (a), Pasireótido (SOM230) (b), β -Amiloide (1-42) (c) y β -Amiloide (25-35).95

Figura 5.23: Espectros de extinción de la suspensión coloidal AgHxC1 en presencia del péptido LAN a diferentes concentraciones: (a) en ausencia, (b) presencia de KNO₃ (0.5 M) y (c) variación de la posición del máximo de resonancia del plasmón a diferentes concentraciones del péptido LAN. Imágenes TEM de los agregados globulares (d) y en cadenas (e) de las NPs de Ag en presencia del péptido LAN a la concentración de 1 μ M. La barra de escala corresponde a 100 nm.98

Figura 5.24: Espectros de extinción de la suspensión de AuCT₅₀ en presencia del péptido LAN a diferentes concentraciones: (a) en ausencia, (b) presencia de KNO₃ (0.5 M) y (c) variación de la posición de la Banda L a diferentes concentraciones del péptido LAN. Imágenes TEM de los agregados en cadenas (d) y globulares (e) de las NPs de Au en presencia del péptido LAN a una concentración de 1 μM. La barra de escala corresponde a 100 nm. 99

Figura 5.25: Correlación de imágenes TEM (a, c) y SEM (b, d) del péptido LAN (1 μM) en presencia de coloide de NPs de Ag (a y b) y Au (c y d). 101

Figura 5.26: (a) Imagen TEM del coloide de AuCT₅₀ en presencia del péptido LAN (1 μM). (b) Detalle de la imagen TEM-a donde se puede apreciar claramente la corona de péptido (~7 nm de grosor) que rodea a la NP de Au. (c) Estructura del péptido LAN obtenida de la base de datos de PubChem [236] y visualizada con el GaussView 5.0 (<http://www.gaussian.com>) [237]. 102

Figura 5.27: (A) Espectro Raman del péptido LAN (20 mM) en disolución acuosa (a) y espectros SERS del Lanreótido sobre AgHxCl agregado con KNO₃ (0.5 M) a diferentes concentraciones: b) 50 nM, c) 80 nM, d) 0.1 μM, e) 0.5 μM, f) 1 μM y g) 5 μM. (B) Recta de calibrado obtenida a partir de la variación de la intensidad de la banda marcadora a 770 cm⁻¹ con la concentración del péptido LAN en AgHxCl en la región 50 nM – 0.5 μM. *Figura Insertada:* Representación global de la variación de la intensidad de la banda marcadora a 770 cm⁻¹ con la concentración del péptido LAN en un intervalo de linealidad situado entre 50 nM y 10 μM. Excitación a 532 nm. 103

Figura 5.28: (A) Espectro Raman del péptido LAN (20 mM) en disolución acuosa (a) y espectros SERS del Lanreótido sobre AuCT₅₀ agregado con KNO₃ (0.5 M) a diferentes concentraciones: b) 3 nM, c) 8 nM, d) 50 nM, e) 0.5 μM, f) 3 μM y g) 8 μM. (B) Recta de calibrado obtenida a partir de la variación de la intensidad de la banda marcadora a 770 cm⁻¹ con la concentración del péptido LAN en AuCT₅₀ en la región 5 – 10 nM. *Figura Insertada:* Representación global de la variación de la intensidad de la banda marcadora a 770 cm⁻¹ con la concentración del péptido LAN en un intervalo entre 1 nM y 100 μM. Excitación a 785 nm. 106

Figura 5.29: Espectros de extinción del péptido SOM230 a diferentes concentraciones sobre coloide AgHxCl y activado con KNO₃ (0.5 M) (a). Variación de la posición e intensidad de la Banda L de los agregados con el cambio de la concentración del péptido SOM230 (b). Imágenes TEM correspondiente a los agregados lineales (c) y globulares (d) que se forman por la interacción del péptido con las NPs de Ag a concentración 1 μM. 108

Figura 5.30: *Izquierda:* Espectros de extinción de las NP AuCT₅₀ activados con KNO₃ (0.5 M) (a) y en presencia del péptido SOM230 a diferentes concentraciones: 10 nM (b), 30 nM (c), 80 nM (d), 0.1 μM (e), 0.3 μM (f), 8 μM (g) y 10 μM (h). *Derecha:* Esquema representativo de los tipos de agregados que se forman por la interacción de las NPs de Au con el péptido SOM230 a diferentes concentraciones: desacoplamiento plasmónico (i), globulares (j), lineales (k) y una NP de Au individual (l). 110

Figura 5.31: Variación de la posición y la relación de intensidades del máximo de la Banda L de los agregados con el cambio de la concentración del SOM230 (a). Imágenes TEM de los agregados lineales (b) y globulares (c) que se forman por la interacción de las NPs de Au con el péptido a concentración 1 μM. 111

Figura 5.32: Imágenes TEM de NPs plasmónicas agregadas en presencia del péptido SOM230 (1 μM) y activadas con KNO₃ (0.5 M): AgHxCl (a) y AuCT₅₀ (b). 112

Figura 5.33: Espectros SERS del péptido SOM230 sobre NPs de Ag (A) y Au (B). Las NPs de plata corresponden al coloide AgHxCl activado con KNO₃ (0.5 M) a diferentes concentraciones de SOM230; a) 10 μM, b) 8 μM, c) 5 μM, d) 1 μM, e) 0.8 μM, f) 0.5 μM, g) 0.3 μM, h) 0.1 μM, i) 80 nM y j) espectro Raman de SOM230 en disolución acuosa 2.5 mM (láser 532 nm). Las NPs de Au corresponden al coloide AuCT₅₀ activado con KNO₃ (0.5 M) a diferentes concentraciones de SOM230; a) 0.3 μM, b) 0.1 μM, c) 80 nM, d) 50 nM, e) 30 nM, f) 10 nM y g) espectro Raman de SOM230 en disolución acuosa 2.5 mM (láser de 785 nm). Los espectros están normalizados a la banda 3400 cm⁻¹ del agua. 115

Figura 5.34: Representación de la intensidad de la banda a 1004 cm⁻¹ de Phe frente a la concentración de SOM230 cuando se encuentra adsorbido sobre AgHxCl (a y b) y AuCT₅₀ (c y d). Las gráficas (a) y (c) corresponden a las regiones en las que se observa un comportamiento lineal entre la intensidad de la banda 1004 cm⁻¹ y la concentración del péptido. Las NPs metálicas fueron activadas con KNO₃ a concentración (0.5M) 118

Figura 5.35: Espectros de extinción del coloide AgHxCl, activado con KNO₃ a 0.5 M en presencia del péptido βAm₂₅₋₃₅ a diferentes concentraciones (a). Variación de la intensidad la Banda L con la concentración del péptido βAm₂₅₋₃₅ (b). 120

Figura 5.36: Imágenes TEM de βAm₂₅₋₃₅ en presencia de NPs de Ag (coloide AgHxCl) activadas con KNO₃ (0.5 M) a diferentes concentraciones del péptido: 10 μM (a) y 2 μM (b). 121

Figura 5.37: Esquema propuesto del proceso de formación del amiloide desde monómeros, oligómeros hasta fibrillas. 122

Figura 5.38: Espectro Raman del βAm₂₅₋₃₅ sólido (a). Espectros SERS del βAm₂₅₋₃₅ sobre AgHxCl activado con KNO₃ (0.5 M) a diferentes concentraciones; 0.8 μM (b), 1 μM (c), 3 μM (d), 5 μM (e), 8 μM (f), 10 μM (g). Derecha: Deconvolución de las bandas en la región 1300-1200 cm⁻¹ (Amida III) de los espectros SERS para las concentraciones: 8 μM (h) y 1 μM (i). Excitación a 532 nm. 124

Figura 5.39: Variación de la intensidad de la banda marcadora SERS a 1445 cm⁻¹ del péptido βAm₂₅₋₃₅ (normalizada a la banda 3400 cm⁻¹ del H₂O) con la concentración en AgHxCl activado con KNO₃ (0.5 M) (a). Recta de calibrado obtenida a partir de la variación de la intensidad de la banda a 1445 cm⁻¹ con la concentración del péptido βAm₂₅₋₃₅ en AgHxCl en la región 5×10⁻⁷-10⁻⁶ M (b). Excitación a 532 nm. 127

Figura 5.40: A) Espectros Raman del péptido βAm₁₋₄₀: Raman normal en estado sólido (a) y SERS sobre NSAg205 a una [βAm₁₋₄₀] de 0.22 μM en modo “micro” (b). Excitación a 633 nm. B) Espectro SERS del complejo ThT:βAm₁₋₄₂ a la concentración [5:0.22] μM en coloide de NSAg205 (a); espectro SERS de [ThT] a 5 μM en presencia de NSAg205 (b); espectro diferencia de (a – b) (c) y espectros Raman normal del βAm₁₋₄₂ en estados sólido. Excitación a 532 nm. 129

Figure 8.1: Up: (a–b) Schematic suggested process to explain the growing sequence of NSAg (silver nanostars) deduced from different Ag nanoparticles observed in Transmission Electron Microscopy (TEM) images, (c) TEM image of Ag/Au hollow nanostar obtain from Ag NS templates. Bottom: (d–g) reaction mechanisms suggested explaining the conversion of one NSAg arm into a hollow structure, by galvanic replacement and Ag redeposition induced by residual citrate. 160

Figure 8.2: (a) TEM image of AuNP in presence of a lanreotide (1 μM). (b) Zoomed image of a gold NP surrounded by a peptide layer (~7 nm of protein corona). (c) Scheme of LAN peptide structure obtain by GaussView 5.0 from a PubChem Compound Database file [236]. 162

TABLAS

Tabla 4.1: Condiciones experimentales para las distintas nanoestrellas de plata donde: T_1 - tiempo transcurrido entre ambas reducciones; $[Ag^+]$ - concentración de la disolución de $AgNO_3$; $[Hx]$ - concentración de la disolución de hidroxilamina 50 % v/v; $V(CT)$ - volumen de citrato trisódico (CT) 1 % p/v añadido; $[Hx]/[Ag^+]$ - relación molar entre las disoluciones de Hx y $AgNO_3$50

Tabla 4.2: Condiciones experimentales para las distintas nanoestrellas huecas bimetálicas obtenidas donde: $[Ag^+]$ - concentración de la disolución de $AgNO_3$; $[Au^{3+}]$ - concentración de la disolución de $HAuCl_4 \cdot 3H_2O$; $[Hx]$ - concentración de la disolución de hidroxilamina 50 % v/v; CT- concentración de citrato trisódico añadido; $[Ag^+]:[Au^{3+}]$ - relación molar entre las disoluciones de $AgNO_3$ y $HAuCl_4 \cdot 3H_2O$51

Tabla 5.1: Valores promedios de las variables morfológicas empleadas para la caracterización de las nanoestrellas: d - diámetro de punta a punta opuesta de la NP, a -largo del brazo, b -ancho de la punta y σ -desviación estándar para $n = 50$69

Tabla 5.2: Valores promedios de las variables morfológicas para las nanoestrellas huecas bimetálicas: d - diámetro de punta a punta opuesta de la NP, a -largo del brazo, b -ancho de la punta; c -grosor de la corteza de la NP y σ -desviación estándar para $n = 30$73

Tabla 5.3: Valores del factor de intensificación (F_I) calculado para cada una de las diferentes NSAg fabricadas utilizando el TP como molécula de prueba.79

Tabla 5.4: Valores de F_I obtenidos para las nanoestrellas huecas bimetálicas fabricadas y nanoesferas de Au utilizando dos líneas de excitación 532 y 785 nm.81

Tabla 5.5: Valores medios del diámetro (d) junto con su desviación estándar (σ) del tamaño de las nanopartículas de Ag y Au, así como de la corona peptídica (s) formada por los péptidos Lanreótido y Pasireótido alrededor de las NPs como consecuencia de su adsorción. El número de muestra analizado fue $n = 80$ 113

Tabla 5.6: Deconvolución de la banda Amida III con la contribución porcentual de las diferentes estructuras secundarias resultantes obtenidas a partir de los espectros SERS del βAm_{25-35} sobre NPs de Ag a una λ de excitación de 532 nm (fig. 5.38 (h-i))..... 125

LISTADO DE SÍMBOLOS Y ACRÓNIMOS

AgCT: coloide de nanoesferas de plata - citrato

AgHxCl: coloide de nanoesferas de plata – clorhidrato de hidroxilamina

as: asimétrico

AuCT: coloide de nanoesferas de oro – citrato, con NPs de diámetro medio de 10 nm

AuCT₅₀: coloide de oro – citrato, con NPs de diámetro medio de 50 nm

CR: Rojo Congo

CT: citrato trisódico

DFM: microscopia de campo oscuro

DMSO: Dimetil sulfóxido

EM: electromagnético

F_I: factor de intensificación

FTIR: espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier

FT-Raman: espectroscopía Raman por transformada de Fourier

H₂O: agua

HPLC: cromatografía líquida de alta resolución

HS: punto caliente (*hot spot*)

Hx: solución de hidroxilamina al 50 % (w/w) en agua

HxCl: clorhidrato de hidroxilamina

LG: lucigenina

LOD: límite de detección

LSP: plasmón de superficie localizado

LSPR: resonancia de plasmón de superficie localizado

Naph: grupo naftil

NIR: infrarrojo cercano

NP: nanopartícula

NSAg: coloide nanoestrellas de plata

NSAgAu: coloide nanoestrellas huecas bimetálicas de plata/oro

NSH: nanoestrellas huecas

Ph: anillo bencénico

ppb: partes por billón (ng/mL)

ppm: partes por millón (μg/mL)

s: simétrico

SEM: microscopía electrónica de barrido

SERS: espectroscopía Raman intensificada por superficie (*Surface-Enhancement Raman Spectroscopy*)

T₁: tiempo transcurrido entre reducciones

TC: transferencia de carga

TEM: microscopía electrónica de transmisión

ThT: tioflavina T

UV: ultravioleta

τ : modo *twisting*

δ : deformación

γ : vibración fuera del plano

v: tensión de enlace

ρ : modo *rocking*

CÓDIGOS DE TRES Y UNA LETRAS PARA LOS AMINOÁCIDOS

Alanina	Ala, A	Lisina	Lys, K
Arginina	Arg, R	Metionina	Met, M
Ácido aspártico	Asp, D	Fenilalanina	Phe, F
Asparagina	Asn, N	Prolina	Pro, P
Cisteína	Cys, C	Serina	Ser, S
Ácido Glutámico	Glu, E	Tirosina	Tyr, Y
Glicina	Gly, G	Treonina	Thr, T
Glutamina	Gln, Q	Triptófano	Trp, W
Histidina	His, H	Valina	Val, V
Isoleucina	Ile, I		

1. Introducción

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Alzheimer (AD, del inglés *Alzheimer's Disease*) es la causa más común de insuficiencia mental progresiva en las personas de avanzada edad y una causa importante de discapacidad y muerte en el mundo desarrollado. La enfermedad se caracteriza principalmente por dos lesiones neuropatológicas: i) los ovillos neurofibrilares intraneuronales, compuesto por la proteína tau, y ii) las placas amiloides extracelulares, compuesto principalmente por el péptido β -Amiloide (β Am) [1, 2]. El β Am se produce como un monómero, en determinados sitios dentro de las células y entra rápidamente en equilibrio con dímeros y trímeros, proceso similar al descrito para β Am sintético. Se ha visto que una fracción de estos oligómeros es altamente estable (ya sea a través de fuertes interacciones hidrofóbicas o entrecruzamientos covalentes), y una porción de éstos se secreta posteriormente al exterior de las células. Estos oligómeros de β Am secretados pueden interactuar con las neuronas, alterando su actividad eléctrica y fisiológica normal [2].

Los procedimientos de diagnóstico son fundamentales en el tratamiento eficaz de las enfermedades y por tanto, es de gran importancia el correcto enfoque de las herramientas de diagnóstico para lograr tal propósito. Mientras que las herramientas de diagnóstico tradicionales se han utilizado con gran eficacia en la práctica clínica, actualmente se han realizado grandes progresos en los estudios biológicos fundamentales de las enfermedades. Éstos han revelado una nueva variedad de biomarcadores que se encuentran a muy bajas concentraciones o no son adecuados para la detección por los métodos tradicionales. El aumento de la demanda en la detección de biomarcadores moleculares está impulsando el desarrollo de sensores ultrasensibles, y es aquí donde los nuevos y emocionantes descubrimientos de nanomateriales exhiben aplicaciones prometedoras [3].

La interacción entre las NPs metálicas y los sistemas biológicos se producen, por lo general, a través de uniones covalente NP-proteína o mediante la fisisorción de la proteína sobre la superficie metálica. Los nanomateriales terapéuticos dirigidos pueden llevar a cabo su función en dependencia de las biomoléculas a las que se encuentren unidos, siendo mayoritariamente las proteínas del suero de la sangre las que se adsorben

a las NPs, después de la introducción a un entorno *in vivo*, creando una corona de proteínas alrededor de la nanopartícula. Por lo tanto, resulta de gran interés comprender de forma general cómo se produce esta unión NP-proteína. La estructura y función que puedan ejercer se verán influenciadas por las características de las NPs como el tamaño, la curvatura, la morfología, la estructura cristalina, y la química superficial [4, 5]. Además, la interacción de péptidos con metales es de una importancia enorme en el campo de la biofuncionalización con vistas a la aplicación de sistemas mixtos metal-biomolécula en teranóstica.

La espectroscopía SERS (siglas derivadas del inglés: *Surface Enhancement Raman Spectroscopy*) se ha venido desarrollando en los últimos años de forma acelerada debido al aumento de las prestaciones de los soportes metálicos con propiedades plasmónicas que son los que hacen posibles su existencia. La preparación de nanopartículas (NPs) metálicas con morfologías bien definidas como por ejemplo: nanoesferas, nanoprismas triangulares, nanocubos, nanooctaedros, nanovarillas, nanodiscos y nanoestrellas, han permitido el avance en la espectroscopía SERS debido a la gran intensificación del campo electromagnético (EM) que ocurre en la superficie de estas NPs, producida por la resonancia de plasmones de superficie localizados [6, 7]. Las propiedades intrínsecas de las nanoestructuras metálicas se pueden modificar mediante el control de su tamaño, forma, composición, cristalinidad y estructura (e.g. sólida frente hueca). Recientemente, se ha puesto especial atención al control de la forma de las nanoestructuras, pues en muchos casos permiten ajustar con precisión sus propiedades físico-químicas con una mayor versatilidad [8].

Un proceso fundamental para que ocurra intensificación Raman a través del efecto SERS es la adsorción física o química de la molécula sobre la superficie de las nanoestructuras metálicas. En muchos casos este fenómeno se produce espontáneamente debido a la estructura de la molécula. Sin embargo, muchas veces las moléculas de interés no presentan afinidad alguna, o ésta es muy baja, por la superficie metálica. Es en estos casos cuando se hace necesario acudir a la funcionalización de las superficies plasmónicas con las moléculas receptoras adecuadas para poder detectarlas mediante SERS [9, 10].

Entre las diferentes nanopartículas que se han investigado en los últimos años, las nanoestrellas representan un tipo de sustratos SERS de gran futuro debido a los altos valores de intensificación de la señal SERS que se consiguen. En la presente Tesis se

proponen dos métodos de fabricación de nanoestrellas (NS) metálicas como soportes para espectroscopía SERS: i) obtención de nanoestrellas de plata (NSAg) mediante procesos de crecimiento en dos pasos y ii) obtención de NS huecas bimetálicas (Ag/Au) mediante un proceso de reemplazamiento galvánico partiendo de NSAg utilizadas como semillas. También se realiza la caracterización físico-química de las NPs obtenidas mediante espectrofotometría UV-visible, microscopía electrónica de transmisión y barrido acoplado a un detector de dispersión de energía de rayos-X (EDX) y espectroscopía Raman y SERS.

En el presente trabajo se muestran los resultados en la caracterización vibracional mediante espectroscopía Raman y SERS de los colorantes histológicos Rojo Congo y tioflavina T, que son sustancias comúnmente utilizadas como marcadores de agregados de β Am. También se estudia el mecanismo de interacción de éstas moléculas con la superficie metálica de las NS utilizadas como substratos SERS a través de las correspondientes isothermas de adsorción. El análisis de la región de linealidad derivada del estudio de la isoterma de adsorción permitió conocer el límite de detección y la sensibilidad de la técnica SERS en la detección de las biomoléculas estudiadas.

Finalmente, se muestran los resultados encontrados en el estudio estructural realizado a diferentes péptidos fibrogénicos cuyo mecanismo de adsorción sobre las superficies metálicas de las nanopartículas empleadas también se ha deducido. Teniendo en cuenta la interacción NP-proteína, se estudió la correlación entre la adsorción de los péptidos fibrogénicos y los procesos de fibrilación con el valor añadido de que esta investigación se ha realizado a muy bajas concentraciones. En estas condiciones se ha investigado la influencia de las NP plasmónicas sobre los procesos de fibrilación de estas importantes biomoléculas.

La investigación realizada en la presente Tesis es de interés por una parte en la biofuncionalización de NP para fines biomédicos (reparto de fármacos, *imaging*, etc.), y por otra la de diseñar posibles estrategias para biodiagnos y terapia, es decir, teranóstica, de enfermedades relacionadas con amiloides.

2. Antecedentes

2. ANTECEDENTES

2.1 FUNDAMENTOS DE LA ESPECTROSCOPIA VIBRACIONAL RAMAN

La espectroscopía vibracional es una herramienta básica que se utiliza en el estudio, caracterización y sistematización de sistemas moleculares ya que nos proporciona la huella digital de moléculas diatómicas o poliatómicas, iones moleculares y radicales libres. Existe una gran versatilidad de métodos físicos para determinar las vibraciones moleculares usando neutrones, electrones o fotones. La absorción y la dispersión inelástica de fotones dan lugar a dos técnicas fundamentales y complementarias como: la espectroscopía infrarroja y la espectroscopía Raman [11].

La espectroscopía no es más que el estudio de la interacción entre la radiación electromagnética y la materia [12, 13]. Cuando un haz de luz interactúa con la materia, éste puede ser: absorbido, emitido, reflejado o dispersado por la misma, dependiendo de las características de ambos, estos procesos permiten el estudio de la materia mediante una técnica espectroscópica determinada[13]. Durante la interacción de la radiación primaria o incidente con la molécula puede haber una transferencia de energía vibracional y/o rotacional, por lo que se puede detectar una radiación secundaria de mayor o menor energía. Las diferencias de energía entre la radiación primaria y la secundaria corresponden a las energías moleculares vibracionales o rotacionales.

El análisis mediante espectroscopía Raman se basa en el examen de la luz dispersada por un material al incidir sobre él un haz de luz monocromática. Una pequeña porción de la luz es dispersada inelásticamente experimentando ligeros cambios de frecuencia que son característicos del material analizado e independiente de la frecuencia de la luz incidente [14].

2.1.1 Breve descripción del efecto Raman

El fenómeno conocido como efecto Raman fue descrito por el físico indio Chandrasekhara Venkata Raman en el año 1928, lo que le supuso la concesión del premio Nobel de física en el año 1930. Este científico dio nombre al fenómeno inelástico de dispersión de la luz, lo cual permitió el estudio de los espectros de rotación y vibración de las moléculas.

El efecto Raman es un fenómeno de dispersión de la luz en el que si un fotón interactúa con una molécula, pueden ocurrir dos procesos de dispersión diferentes, ver diagrama energético de la figura 2.1:

- ✓ Dispersión elástica o Rayleigh: el fotón emitido tiene la misma longitud de onda (misma frecuencia y energía) que el fotón incidente.
- ✓ Dispersión inelástica: hay un cambio en la frecuencia (energía y longitud de onda) entre el fotón incidente y el emitido. Este cambio o desplazamiento puede ocurrir de dos maneras:
 - dispersión Stokes: cuando el fotón le cede energía a la molécula, la energía de la radiación dispersada es menor que la de la radiación incidente
 - dispersión anti-Stokes: si el fotón obtiene energía de la molécula se observa lo contrario, o sea, la energía de la radiación dispersada es mayor que la de la radiación incidente.

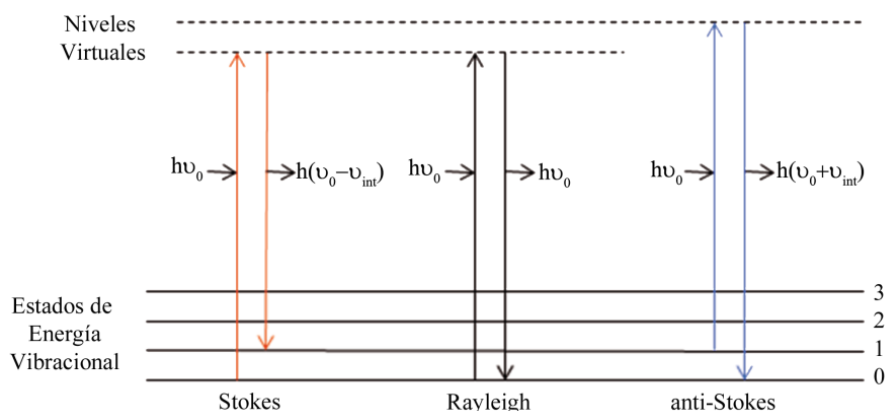


Figura 2.1: Diagrama de niveles de energía con la representación de las tres formas de dispersión de la radiación electromagnética. La energía de la radiación incidente ($h\nu_0$) es igual a la de la radiación emitida en la dispersión Rayleigh, menor ($h(\nu_0 - \nu_{int})$) en la Stokes y mayor $h(\nu_0 + \nu_{int})$ en la anti-Stokes.

Las variaciones de frecuencia observadas en el fenómeno de dispersión Raman son equivalentes a variaciones de energía. Los iones y átomos enlazados químicamente para formar moléculas y redes cristalinas, están sometidos a constantes movimientos vibracionales y rotacionales. Estas oscilaciones se realizan a frecuencias bien determinadas en función de la masa de las partículas que intervienen y del comportamiento dinámico de los enlaces existentes. A cada uno de los movimientos vibracionales y rotacionales de la molécula le corresponderá un valor determinado de la energía molecular (ν_{int}) [14-16].

Para que una molécula exhiba el efecto Raman, se requiere un cambio de la polarizabilidad molecular, parámetro que mide la deformación de la nube electrónica como consecuencia de la interacción de la radiación electromagnética con la materia. Este efecto genera un momento dipolar inducido debido a la polarizabilidad de la molécula y viene dado por la siguiente ecuación:

$$\vec{\mu} = \alpha \cdot \vec{E} \quad (2.1)$$

Donde $\vec{\mu}$ es el momento dipolar inducido, α la polarizabilidad molecular y \vec{E} es la intensidad del campo eléctrico externo. El carácter variable del campo ($E = E_0 \cos \omega_0 t$) convierte este momento dipolar en un emisor de radiación electromagnética.

El desplazamiento Raman coincide con las diferencias de los estados vibracionales o rotacionales de la molécula, mientras que los valores absolutos de frecuencia no dependen del proceso (bien sea dispersión Stokes o anti-Stokes). Por lo tanto, el espectro Raman es simétrico respecto de la banda Rayleigh. Aunque la dispersión inelástica de la luz fue predicha por Smekal en 1923, hasta el 1928 no fue observado experimentalmente. El efecto Raman fue reportado inicialmente por C. V. Raman y K. S. Krishnan e independientemente por Grigory Landsberg y Leonid Mandelstam en 1928.

La espectroscopía Raman se ha empleado en el análisis de los materiales, pues la información vibracional de los enlaces químicos que caracterizan las moléculas es muy específica, proporcionando verdaderas “huellas dactilares” que permiten la identificación de la especie analizada y de cómo su estructura se ve afectada por el entorno químico que la rodea. Además, al contrario que la espectroscopía IR, la señal Raman emitida por el agua es débil, lo que facilita el estudio de disoluciones acuosas [17].

Solo una fracción muy pequeña de los fotones incididos (aproximadamente uno en 10^7 - 10^8 fotones) son dispersado por efecto Raman. Esta debilidad intrínseca hace que se precise del uso de fuentes de excitación láser, capaces de proporcionar una luz intensa, altamente monocromática y coherente, otra principal desventaja de esta técnica es la eventual presencia de emisión de fluorescencia, que puede llegar a ocultar la señal Raman. Una solución experimental para reducir la fluorescencia consiste en el uso de láser a menor energía, pero en muchos casos no es posible evitar el solapamiento de las dos emisiones (Raman y fluorescencia) al mismo tiempo.

2.2 ESPECTROSCOPIA RAMAN INTENSIFICADA POR SUPERFICIE

El efecto SERS fue descubierto por Fleischmann et al. en 1974 [18], al intentar registrar el espectro Raman de la piridina sobre un electrodo de plata sometido a varios ciclos de oxidación-reducción. Aunque en un primer momento se creyó que la intensificación Raman era debida al incremento del área superficial producida por el proceso redox, posteriormente se pudo demostrar que éste no podía ser el único efecto presente, y que estaba actuando un fenómeno nuevo y desconocido que dio lugar al nacimiento en 1977 de la espectroscopía SERS [19, 20]. Desde entonces, se han realizado numerosos estudios teóricos y experimentales para explicar este fenómeno. Así, se ha visto que dicho efecto se basa en el aumento de la dispersión inelástica (señal Raman) procedente de determinadas moléculas cuando se hallan en presencia de una superficie metálica nanoestructurada especialmente preparada, cuya intensidad excede en un factor de $\sim 10^6$ del que se observa en ausencia del metal. Otra característica general de este efecto es la marcada dependencia de la intensificación observada con la naturaleza del metal empleado y su morfología superficial, la naturaleza de la molécula a estudiar y un gran número de variables experimentales (concentración, potencial del electrodo, longitud de onda de excitación). Además, la intensificación no es uniforme en todas las bandas del espectro Raman, sino que ciertas bandas se intensifican más que otras. Esta intensificación relativa puede ser muy variable incluso para una misma molécula, dependiendo de las condiciones particulares de cada registro.

2.2.1 Propiedades ópticas de las nanoestructuras metálicas

El término **plasmones de superficie** (SP, por sus siglas en inglés) se refiere a las oscilaciones coherentes colectivas de los electrones de conducción en metales (y materiales con electrones libres) como respuesta a una luz incidente [7, 21-23]. Si la radiación electromagnética incide sobre la interfase metal-dieléctrico se produce la excitación de los SPs generándose ondas electromagnéticas que se propagan a lo largo de la interfase, lo que se conoce como **polaritones de plasmones de superficie** (SPP), ver fig. 1.2A. Estas oscilaciones pueden estar fuertemente confinadas a la interfase metal-dieléctrico, y actúan como una guía de ondas, siendo éstas evanescentes, o sea, que no se propagan ni en el interior del metal ni en el dieléctrico, y van perdiendo

intensidad a medida que se propagan. Cuando las dimensiones de los materiales plasmónicos se encuentran en la escala nanométrica (nanopartículas), los SPPs dejan de existir y los modos electromagnéticos que tienen lugar se conocen como **plasmones de superficie localizados (LSP)**, los cuales están altamente influenciado por las condiciones de contorno (fig. 1.2B) [7, 24].

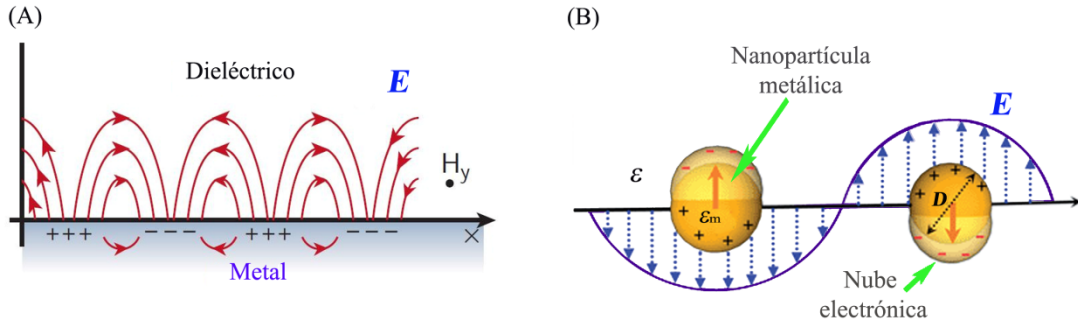


Figura 2.2: (A) Representación esquemática de los modos SPP en la interfase metal-dieléctrico. (B) Plasmones de superficie localizados en una nanopartícula de diámetro D .

Para una partícula metálica de dimensiones muy pequeñas en relación a la longitud de onda de la radiación incidente ($D \ll \lambda$, donde D es el diámetro de la partícula metálica), los SPP se encuentran localizados dando lugar a formación de LSP que resuenan en una frecuencia determinada y que es función de su función dieléctrica, de la morfología y del tamaño de la nanoestructura. Si se hace incidir un fotón sobre la superficie en condiciones de resonancia con la frecuencia de los LSP, éstos son excitados, dando lugar al fenómeno conocido como **Resonancia de Plasmón Superficial Localizado (LSPR)**, por sus siglas en inglés), este efecto a su vez conduce a la polarización de la NP como muestra la fig. 2.2B.

2.2.2 Plasmones localizados en estructuras metálicas de diferentes formas y tamaños

Las nanopartículas de metales nobles como plata, oro y cobre poseen plasmones de superficie localizados con resonancias en la región visible del espectro electromagnético [25, 26]. Las frecuencias LSPR se pueden modular para un mismo metal controlando las características geométricas de las NPs tales como el tamaño, la forma, la rugosidad de la superficie y el espacio entre partículas [27, 28]. La absorción y la dispersión de la luz por las partículas se ha estudiado desde el punto de vista clásico desde hace mucho

tiempo [29, 30]. También se conocen las soluciones analíticas para partículas con formas simples como cilindros, esferas o elipsoides [29]. Para partículas que presentan formas más complejas y arbitrarias se requieren en general cálculos numéricos [17]. Los avances teóricos en los estudios de la interacción de la luz con nanoestructuras metálicas complejas han permitido el desarrollo de la técnica SERS destacando así la importancia de los plasmones localizados en nanopartículas metálicas. En los últimos años se han publicado trabajos que estudian nanopartículas aisladas con forma arbitraria, con esquinas, puntas, etc. [11, 31-34].

Así por ejemplo, la intensificación LSPR inducida por una esfera metálica depende de la polarización generada por el campo externo en ella, y del momento dipolar asociado, que viene dado por la expresión [35]:

$$\vec{p} = a^3 \frac{\varepsilon(\omega) - 1}{\varepsilon(\omega) + 2} \vec{E}_0 = g(\omega) \vec{E}_0 \quad (2.2)$$

Siendo \vec{p} la polarizabilidad de la nube electrónica, $\varepsilon(\omega)$ la permitividad eléctrica del material, \vec{E}_0 el campo aplicado y a el radio de la esfera. En metales, la parte real de la permitividad puede ser negativa, debido al desfase existente entre el campo eléctrico externo y la polarización inducida, y en los casos en los que se cumple $\text{Re}[\varepsilon(\omega)] \approx -2$, y $\text{Im}[\varepsilon(\omega)] \approx 0$, se tienen las condiciones necesarias para que se produzca una intensificación por LSPR. Esto ocurre para el caso de los metales plata, oro y cobre fundamentalmente.

Recientemente se han publicado estudios experimentales de dispersión de la luz por NPs con formas peculiares, como nanoestrellas o nanoflores. Este tipo de nanoestructuras obtenidas mediante el método de coprecipitación química en suspensiones coloidales (en su mayoría), presentan la ventaja de potenciar el efecto SERS sin necesidad de añadir agentes de agregación externo. Pues debido a esta geometría de puntas, vértices y curvaturas, los plasmones localizados dan lugar a una gran intensificación SERS [36-39].

2.3 REGLAS DE SELECCIÓN

Para explicar el efecto SERS se han propuesto un gran número de mecanismos y múltiples variantes de cada uno de ellos, actualmente se acepta la existencia principalmente de dos contribuciones al fenómeno SERS: mecanismo de intensificación

electromagnético (EM) y el mecanismo químico o de transferencia de carga (TC). Así, se considera que el mecanismo EM debe estar presente en toda la experiencia SERS suficientemente intensa, mientras que el mecanismo TC puede o no participar, dependiendo de las condiciones [40]. Sin embargo, no existe un acuerdo definitivo acerca de la contribución de cada uno de ellos en el factor de intensificación total.

2.3.1 Mecanismo Electromagnético

El efecto SERS está determinado por tres componentes principales: la molécula, la nanoestructura metálica y la radiación electromagnética [40]. La absorción y dispersión de la luz por las nanopartículas (NPs) metálicas (cuyo tamaño debe de ser menor que longitud de onda de la luz) se considera la propiedad más importante que da lugar al efecto SERS. La posición de la frecuencia de oscilación plasmónica en el espectro electromagnético está determinada por la función dieléctrica del metal, o permitividad eléctrica, y por la forma y el tamaño de la NP. Para una NP suficientemente pequeña, todas las transiciones electrónicas interbandas se consideran insignificantes excepto el plasmón asociado al dipolo (aproximación dipolar). Estos sistemas con electrones libres o casi libres presentan un tipo determinado de excitación, correspondiente al plasmón de superficie. La resonancia plasmónica es de tal naturaleza que cuanto más libres se encuentran los electrones, más estrecha e intensa es la resonancia plasmónica dipolar. La radiación dipolar emitida por la NP consigue llegar a un estado estacionario unos femtosegundos después de la iluminación del láser y es caracterizada por una distribución espacial de las magnitudes del campo, donde la intensidad de la radiación es nula en algunas regiones del espacio circundante de la NP, mientras que en otras regiones cerca del metal se amplifica [25, 29, 40].

Puesto que el efecto SERS está relacionado con la existencia de una geometría rugosa en la superficie metálica, el modelo EM puede simplificarse considerando la intensificación de la señal Raman cuando una radiación de frecuencia ω_0 incide sobre una nanopartícula. En la fig. 2.3 se muestra un esquema del fenómeno que tiene lugar en un proceso de dispersión Raman en ausencia y presencia de NPs metálicas.

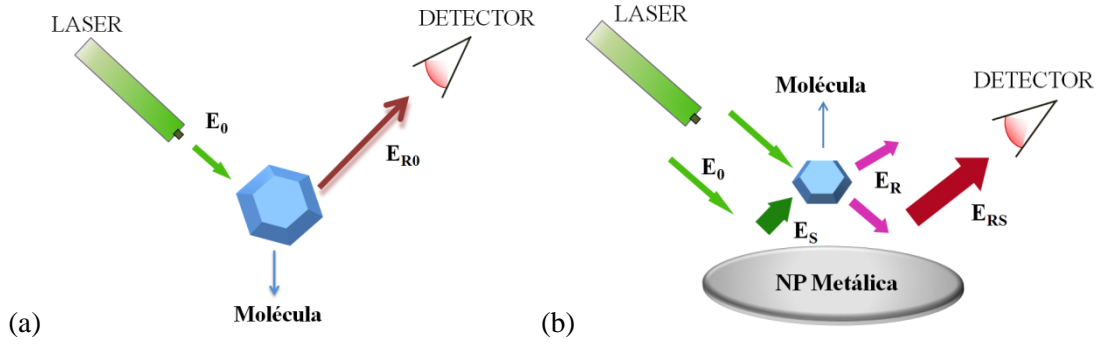


Figura 2.3: Proceso de dispersión Raman en ausencia (a) y presencia (b) de una nanopartícula metálica

La gran intensificación que experimenta la radiación Raman se debe a dos procesos fundamentales:

1) *Intensificación del campo EM incidente sobre la molécula:* la intensidad del campo EM que incide sobre la molécula situada en la posición r' está compuesta por la intensidad del campo E_0 de la radiación láser a la frecuencia ω_0 y de la del campo a la misma frecuencia dispersado propio metal E_S . Por lo tanto, el campo eléctrico total que incide sobre la molécula en r' será:

$$E_{tot}(r', \omega_0) = E_0(r', \omega_0) + E_S(r', \omega_0) \quad (2.3)$$

Cuando la frecuencia ω_0 se hace coincidir con la frecuencia de resonancia de los plasmones superficiales del metal (ver definición más adelante), el campo dispersado E_S resulta ser mucho mayor y la expresión anterior se puede aproximar a:

$$E_{tot}(r', \omega_0) \approx E_S(r', \omega_0) = gE_0(r', \omega_0) \quad (2.4)$$

donde g es la amplificación del campo EM por parte de la NP metálica. Este campo incidente induce en la molécula un momento dipolar $p(r', \omega_0)$ que, modulado por las vibraciones moleculares, emitirá radiación Raman de frecuencia ω_R . El momento dipolar puede ser expresado en función de la polarizabilidad de la molécula:

$$p(r', \omega_0) = \alpha_R E_{tot}(r', \omega_0) \quad (2.5)$$

La radiación Raman dispersada por la molécula tendrá así un campo eléctrico de intensidad E_R proporcional a $\alpha_R E_S$.

2) *Intensificación de la Radiación Raman:* la radiación Raman de frecuencia ω_R puede ser amplificada a su vez por la NP, de la misma forma que la radiación láser, con un factor g (que indica la intensificación del campo a la longitud de onda Raman, ω_R , la

cual puede diferir del valor a la longitud de onda incidente ω_0). De este modo el campo eléctrico total dispersado, de frecuencia ω_R , que se observa en la posición r (detector), es una composición del campo dispersado directamente por la molécula de intensidad $E_R(\omega_R)$ mientras que el campo dispersado por la NP cuando son excitados los plasmones superficiales su intensidad es $E_{RS}(\omega_R)$:

$$E_{SERS}(r, \omega_R) = E_R(r, \omega_R) + E_{RS}(r, \omega_R) \quad (2.6)$$

En condiciones de resonancia plasmónica, la amplitud total del campo dispersado será:

$$E_{SERS} \approx E_{RS} \propto g' E_R \propto g' \alpha_R E_S \propto g g' \alpha_R E_0 \quad (2.7)$$

Y la intensidad SERS será proporcional al cuadrado del módulo de E_{SERS} :

$$I_{SERS} \approx |g g'|^2 |\alpha_R|^2 I_0 \quad (2.8)$$

Donde I_0 es la intensidad del campo incidente. Para bandas de bajo número de ondas, es decir, cuando la diferencia entre ω_R y ω_0 es mínima, $g \sim g'$ y la intensidad SERS será amplificada con un factor proporcional a la cuarta potencia de la amplificación del campo cercano local incidente $|g|^4$.

Se puede definir un factor de intensificación G o también asignado como F_I (notación que se utilizará más adelante) de la siguiente manera:

$$G = \frac{I_{SERS}}{I_{Raman}} = \left| \frac{\alpha_R}{\alpha_{R0}} \right|^2 |g g'|^2 \quad (2.9)$$

Donde I_{Raman} es el valor de la intensidad del campo eléctrico dispersado inelásticamente en ausencia del metal y α_{R0} la polarizabilidad Raman en ausencia del metal [41-43].

Resumiendo el significado de la ecuación 2.8 se puede decir que:

- La mayor contribución al efecto SERS procede de la dispersión por parte del metal, más que por parte de la molécula, cuyo espectro Raman se ve de todos modos reflejado en el espectro SERS de la luz dispersada por el metal.
- La intensidad SERS depende de $|g|^4$. Esta dependencia es clave para entender las poderosas amplificaciones que el SERS produce. Es por ello que para NPs de plata con un máximo del plasmón a 400 nm, g es ~ 30 , pero se produce una amplificación G

$\sim 8 \times 10^5$, suponiendo que la polarizabilidad Raman no cambia respecto a la de la molécula aislada [44].

- La polarizabilidad Raman de la molécula puede alterarse drásticamente con respecto a la de la molécula aislada (variando su magnitud, simetría y propiedades de resonancia) cuando interacciona directamente con el metal. Esto resulta particularmente evidente en sistemas molécula/metal donde se realizan procesos de TC.

El valor de G depende de varios factores: i) de la morfología de la partícula metálica, ii) de la distancia a la superficie r y iii) de la permitividad dieléctrica del metal (ϵ) y del medio que lo rodea (ϵ_0). El modelo electromagnético predice un factor de intensificación de la señal Raman del orden de 10^6 , que coincide en gran medida con los valores de G obtenidos experimentalmente. Es por ello que se puede concluir que el factor de intensificación debido al efecto SERS depende de: la forma y tamaño de las nanopartículas y de la distancia a la que se encuentra la molécula sobre la superficie metálica (1-10 nm de distancia) ya que es una técnica de corto alcance [11, 40, 45].

En el caso de la esfera, el campo eléctrico externo disminuye con la distancia según $\left[\frac{R}{(R + d)} \right]^{12}$, donde R es el radio externo de la NP y d es la distancia al centro de la NP. Los resultados experimentales indican que la intensificación resulta detectable para distancias menores de $\sim 100 \text{ \AA}$ [40, 41]. El enorme gradiente del campo EM existente sobre la superficie metálica, hace que los modos vibracionales con los relacionados con los grupos moleculares del analito que se encuentran más cercanos a la superficie den lugar a una mayor intensidad SERS con respecto a los grupos más alejados. Este efecto de la proximidad puede ser utilizado para conocer el mecanismo mediante el cual se produce la interacción entre el adsorbato y el metal.

El efecto SERS posee unas reglas de selección distintas a las que se dan en la espectroscopía Raman convencional y pueden ser explicadas dentro del marco del modelo EM. Estas reglas operan sobre los modos vibracionales permitidos en Raman, de manera que establecen una distinción entre unos modos más activos, los cuales aparecerán con una mayor intensidad en el espectro SERS, y otros menos activos y menos intensos. En el exterior de la partícula metálica responsable del efecto SERS, las intensidades del campo polarizado paralela o longitudinalmente (E_t) y perpendicular o transversalmente (E_n) a la superficie metálica, no poseen el mismo valor relativo. La relación que guardan ambas magnitudes depende de la longitud de onda de excitación;

así, a una longitud de onda cercana a la de excitación de los plasmones superficiales del metal, se cumple que $Re(\epsilon) \approx -2$, de donde se deduce que $E_n \approx 4E_r$. Esta característica constituye una herramienta de una gran utilidad en la determinación de la orientación de la molécula sobre la superficie, ya que los modos vibracionales perpendiculares a la superficie se ven más intensificados que los modos orientados en dirección paralela [46-48]

2.3.2 Mecanismo de Transferencia de Carga

El mecanismo de transferencia de carga (TC) contribuye también en la producción del efecto SERS a través de un proceso semejante al que produce la Resonancia Raman. El mecanismo TC transcurre mediante un proceso fotoinducido que implica la transferencia de un electrón del nivel de Fermi (E_f) hacia el orbital LUMO (de sus siglas en inglés *Lowest Unoccupied Molecular Orbital*) orbital molecular no ocupado de más baja energía de la molécula adsorbida sobre la superficie del metal, ver la fig. 2.4a. También puede ocurrir el proceso contrario, en el que el electrón va del orbital HOMO (del inglés *Highest Occupied Molecular Orbital*) orbital molecular ocupado de más alta energía hacia el nivel de Fermi del metal, fig. 2.4b [49].

La nube electrónica del analito puede distorsionarse cuando se produce una adsorción directa sobre el metal. Cuando la energía de esta interacción es débil (fisisorción), la modificación de la polarizabilidad del analito α es pequeña y podemos esperar que el espectro SERS se parezca al espectro Raman normal.

La fisisorción puede inducir una orientación molecular fija que, teniendo en cuenta la fuerte polarización del campo local, implica una diferente intensificación de los modos vibracionales dependiendo de su simetría. Por el contrario, cuando la entalpía de absorción es muy negativa y comparable a las energías de un enlace químico (quimisorción), la alteración del volumen de la nube electrónica del adsorbato es significativa, sobre todo en el caso de moléculas pequeñas, y lo que obtenemos es una “nueva” molécula o complejo superficial, con diferente simetría y nuevos estados electrónicos. Además, desde el punto de vista de la intensificación de la señal, la absorción directa sobre la superficie proporciona el máximo factor de intensificación SERS, dando origen al “efecto de la primera capa”. Se trata de un fenómeno limitado a especies situadas en la primera capa de absorción, la que involucra moléculas en

contacto directo con la superficie metálica. En estas condiciones la intensificación SERS global se debe tanto al efecto multiplicativo del mecanismo EM como a la intensificación generada por una transición de transferencia de carga entre el metal y el adsorbato, o viceversa [40, 50].

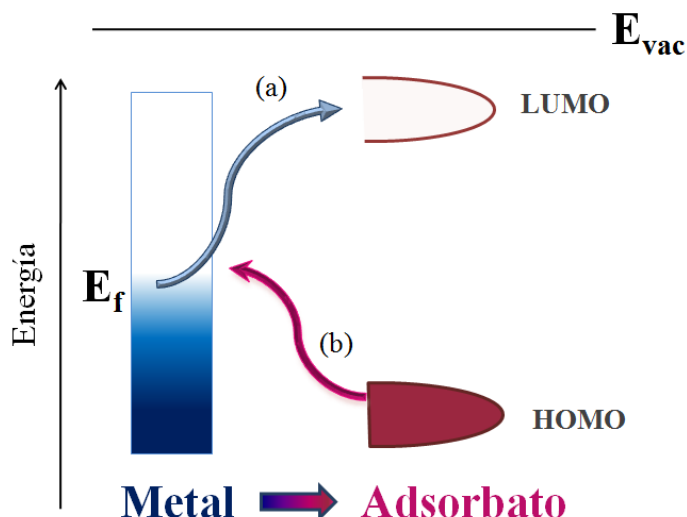


Figura 2.4: Esquema del mecanismo de transferencia de carga que ocurre entre el metal y la molécula en el efecto SERS. TC: metal a molécula $E_f \rightarrow \text{LUMO}$ (a) y TC: molécula a metal $\text{HOMO} \rightarrow E_f$ (b).

La existencia de transferencia de carga es función de la naturaleza del adsorbato y del metal. Por ejemplo, la TC es más probable en moléculas que contienen electrones π en su estructura, tales como las moléculas aromáticas estudiadas en este trabajo. En cuanto al metal, también la morfología de la superficie metálica influye notablemente en la contribución del mecanismo TC a la intensificación global SERS, ya que este mecanismo tiene lugar mayoritariamente en puntos de la superficie en los que existen rugosidades superficiales a escala atómica, llamadas “*adatoms*” [51]. Estos sitios activos constituyen el lugar donde ocurre con más probabilidad la transferencia de carga entre el metal y el adsorbato, por lo que se supone que la fracción de moléculas adsorbidas que contribuyen a la intensificación SERS mediante transferencia de carga es relativamente pequeña.

Tabla 2.1: Comparación de las características de los dos mecanismos de intensificación en la superficie más aceptados según Brolo y colaboradores para el caso de un electrodo [48].

	Mecanismo TC	Mecanismo EM
Origen	El proceso de resonancia involucra la luz incidente y la banda de TC del complejo metal-molécula. (Similar a proceso de Resonancia Raman)	Intensificación del campo eléctrico local debido al acoplamiento del fotón incidente con los plasmones superficiales del metal
Rugosidad	Rugosidad a escala atómica (sitios activos)	Rugosidad a gran escala (10-200 nm)
Dependencia de la distancia	Corto rango. Importante solo para especies adsorbidas directamente sobre la superficie	Amplio rango. Importante incluso para especies que estén alejadas superficie, pero se debilita con la distancia
Dependencia del potencial	La banda de TC puede ser sintonizada por el potencial aplicado; por ello el factor de intensificación depende del potencial	El F_I no depende del potencial aplicado; los cambios en la intensidad en el perfil del potencia se deben a la variación del recubrimiento de la superficie con el potencial
Dependencia de λ_{exc} .	La condición de resonancia depende de la longitud de onda de excitación (λ_{exc}). El potencial al cual la intensidad SER es máxima (E_{max}) depende de la energía del fotón incidente	El F_I depende de la función dieléctrica (ϵ) la cual es dependiente de λ_{exc} . E_{max} no se desplaza por diferentes energías del fotón incidente

A modo de resumen la tabla 2.1 expone las principales características de los dos mecanismos de intensificación en la superficie para el efecto SERS (TC y EM), para superficies rugosas obtenidas en electrodos según la referencia [48].

2.4 SOPORTES PARA ESPECTROSCOPIA SERS

A medida que se ha estudiado y conocido el funcionamiento del efecto SERS, se ha comprendido que el SERS es una intensificación de la radiación Raman llevada a cabo por la presencia de nanoestructuras, más que una intensificación superficial. Este conocimiento se ha puesto de manifiesto gracias al desarrollo de nuevas tecnologías en el campo de la Ciencia de Materiales. Por tal motivo, las superficies metálicas empleadas en espectroscopía SERS deben cumplir ciertos requisitos con respecto a su morfología.

Un sustrato SERS se caracteriza por presentar una superficie metálica nanoestructurada con plasmones activos que dan lugar a una intensificación del campo electromagnético cercano por LSPR. La elección de un sustrato SERS adecuado se realiza bajo los criterios de máxima amplificación de la relación señal/ruido y una óptima reproducibilidad.

El interés por las nanopartículas metálicas con propiedades plasmónicas se ha incrementado durante los últimos años debido a sus versátiles aplicaciones. Hay una amplia lista en las que las nanopartículas metálicas plasmónicas pueden ser de gran utilidad como por ejemplo en: el medio ambiente, la medicina, la química y la óptica, gracias a las potencialidades que presentan en la detección química, diagnóstico clínico, catálisis heterogénea entre otros [52-57]. Estos sistemas son muy sensibles debido a la resonancia del plasmón de superficie localizado que presentan. Al mismo tiempo éstas nanopartículas pueden ser utilizadas como sustratos SERS ya que son capaces de intensificar en gran medida el campo electromagnético en sus inmediaciones [40]. Además, si las NP metálicas que se utilizan como sustrato SERS presentan una morfología adecuada, serían capaces de incrementar aún más la señal Raman. En este caso, se han reportado en la literatura diversas formas de nanopartículas, que propician una mayor intensificación del espectro Raman [32, 58-60].

Por tanto, a modo general, los soportes utilizados se pueden clasificar en cuatro grandes grupos:

1. Películas de islotes metálicos [40, 61]
2. Electrodo metálico de superficie rugosa obtenida a partir de ciclos de oxidación-reducción [18, 49]
3. Nanoestructuras obtenidas mediante litografía sobre una superficie [62]
4. Suspensión de nanopartículas o coloides metálicos [63, 64]

A continuación se describirán brevemente las principales características que distinguen a cada uno de estos soportes.

2.4.1 Películas de partículas metálicas aisladas

Las películas de islotes metálicos se preparan por sublimación y deposición del metal en el vacío. Inicialmente se evapora o sublima el metal que se va a depositar y se transfiere hasta un sustrato frío donde se realiza el proceso de deposición de los átomos y la reorganización de las partículas sobre la superficie del sustrato. La estructura de la película puede ser controlada a través de la velocidad de deposición y del espesor de la masa depositada. Posteriormente, la película se puede modificar con el fin de activar el crecimiento de protuberancias para variar la estequiometría, introducir dopantes o producir la oxidación [40]. La posibilidad de modificar las propiedades del sustrato según las necesidades experimentales y la alta reproducibilidad del proceso de preparación, han convertido a las películas de islotes metálicos en uno de los más exitosos sustratos SERS. Sin embargo, este tipo de sustrato da lugar a factores de intensificación menores de los obtenidos mediante NPs metálicas agregadas en suspensión, debido a las limitaciones que presenta el control de la arquitectura en la escala nanométrica de las mismas [40].

2.4.2 Electrodo metálico de superficie rugosa

Los electrodos rugosos son sustratos en los que se realizan medidas reproducibles con factores de intensificación moderados ($\sim 10^6$). La forma más común de conseguir un electrodo de plata activo en SERS es someter el electrodo original a ciclos de oxidación-reducción en una celda electrolítica que contiene una determinada disolución de sal de plata (en la mayoría de los casos AgNO_3). Durante el semi-ciclo de oxidación, la Ag del electrodo se oxida mientras que en el semi-ciclo de reducción los iones Ag^+ se reducen, depositándose nuevamente en el electrodo, produciendo así la superficie

nanoestructurada en un rango de dimensiones de 25-500 nm. La gran ventaja del empleo de los electrodos metálicos radica en poder controlar y manipular la carga superficial del mismo, permitiendo así modular la absorción y desorción de la molécula sobre la superficie. Mediante estos sustratos se pueden estudiar los fenómenos de TC y la orientación de la molécula sobre la superficie metálica [49, 65, 66].

2.4.3 Nanoestructuras obtenidas mediante litografía sobre una superficie

Las técnicas de nanolitografía son relativamente recientes en la fabricación de sustratos SERS y SEF (del inglés *Surface Enhanced Fluorescence* que significa fluorescencia amplificada por superficie), siendo su principal ventaja el control de la forma y la posición de las nanoestructuras, y con ello, de la longitud de onda de los LSPR y la formación de *hot spots* (HS) o puntos calientes [67]. Con estos sustratos se han observado factores de intensificación de hasta 10^8 .

2.4.4 Suspensión de nanopartículas o coloides metálicos

Desde que en la espectroscopía SERS se utilizaron por primera vez las suspensiones de NPs de oro y plata a finales de la década de los 70's [68], los sustratos SERS más utilizados hasta la fecha han sido los coloides metálicos. Creighton y Albrecht fueron los pioneros en emplear los coloides metálicos como sustratos SERS en el estudio de la piridina en el año 1979 [68]. La fabricación de este tipo de soporte SERS es relativamente sencilla y poco costosa, ya que no requiere de una instrumentación sofisticada y los beneficios relacionados con el factor de intensificación que proporcionan son muy elevados (hasta 10^{11}). Son de hecho, los sustratos empleados en los experimentos de detección de moléculas aisladas [69, 70]

Los coloides metálicos son de fácil preparación y se pueden preparar por reducción química o fotoquímica de una sal del correspondiente catión, generalmente en disolución acuosa. En un principio los coloides metálicos obtenidos fueron suspensiones acuosas de nanoesferas de oro, plata o cobre. Sin embargo, en los últimos tiempos se han fabricado otros sistemas con morfologías diferentes, cuyo uso está también justificado por cálculos teóricos del campo generado sobre estas nanoestructuras, que predicen una mayor intensificación en zonas con mayor curvatura como vértices y valles, que en la superficie de nanopartículas esféricas [26, 33, 71, 72].

Cuando se elige un coloide metálico como sustrato, existen dos formas de realizar un experimento SERS:

- a) El SERS promediado (medición en *macro*): se registra la señal de un conjunto numeroso de NPs en una suspensión.
- b) El SERS de una sola nanopartícula o un solo agregado (medición en *micro*): destinado al estudio de moléculas aisladas y de *hot spots*.

El uso de suspensiones coloidales para estudios SERS promediados presenta varias ventajas. La presencia del disolvente disminuye el riesgo de fotodegradación de la muestra con el láser, permitiendo el uso de potencias superiores y de líneas de excitación más energéticas. Además, los espectros obtenidos son un promedio de las señales de un amplio conjunto de NPs, debido al movimiento Browniano de las mismas en la suspensión coloidal. Por lo tanto, se registran espectros reproducibles que son huellas dactilares características de la molécula y el metal como conjunto.

Las NPs individuales son en general muy poco activas en SERS. El ensamblaje de diferentes NPs para dar lugar a agregados de mayor tamaño resulta ser muy ventajoso en experimentos SERS. Esto es debido al fuerte acoplamiento de plasmones superficiales de las diferentes NPs con formación de gran número de HS, o zonas de máxima intensificación, en los espacios interpartícula. Para incrementar la formación de estos HS es necesario llevar a cabo una agregación adicional de la suspensión coloidal, inducida por la adición de un ión por lo general de carga negativa a la mezcla. Los aniones más empleados son Cl^- , NO_3^- o SO_4^{2-} [73]. Dicha agregación se puede fomentar también mediante el ensamblaje de las NP por ensambladores bifuncionales para obtener HS de tamaño y naturaleza deseados para un análisis específico [74].

Otra estrategia que se puede llevar a cabo para obtener una mayor intensificación SERS es mediante la preparación de NPs de tamaños y formas variadas con morfologías anisotrópicas, dotadas de puntas y vértices. Estas morfologías dan lugar a una fuerte intensificación del plasmón de superficie en estas zonas de alta curvatura [32, 75-77]. El uso de estas NPs es ventajoso por evitar la necesidad de una agregación del coloide, ya que este proceso conduce a una baja reproducibilidad de los experimentos, lo que resulta negativo en aplicaciones analíticas de la técnica SERS.

Hasta el momento se han fabricado NPs anisotrópicas con una gran variedad de tamaños y formas, que además presentan buenas propiedades SERS. Este tipo de

nanopartículas presentan prometedoras aplicaciones en bioimagen y detección debido a las extraordinarias propiedades mostradas en la intensificación del campo EM [78-81].

2.4.4.1 Nanopartículas con forma de estrella

En esta Tesis se ha prestado una especial atención a la fabricación, caracterización y aplicación de nanoestrellas de plata en espectroscopía SERS. En general las nanoestrellas presentan unas propiedades intrínsecas de hibridación que dan lugar a un campo EM intensificado en las zonas de mayor curvatura, como las puntas o las hendiduras. Según se ha podido demostrar, la morfología de las puntas (longitud o ángulo de apertura) y el número de puntas tienen un fuerte efecto sobre la frecuencia e intensidad del plasmón [82].

Los primeros trabajos publicados sobre la síntesis de nanostrellas (NS) se realizó para nanoestrellas de oro y aparecieron en el año 2006 [83, 84]. El protocolo de fabricación llevado a cabo en la obtención de las NS de Au desarrollado se basó en el crecimiento de una “disolución semilla” en varios pasos modulado por la presencia de surfactantes como el CTAB (Bromuro de hexametiltrimetilamonio) y la adición de iones que favorecen el crecimiento de NPs facetadas dando lugar a la formación de NPs con forma de estrella [38, 75, 85, 86]. Las ventajas plasmónicas de las NSs ha hecho que en los últimos años haya aumentado el desarrollo de dispositivos a base de nanoestructuras metálicas con forma de nanoestrellas y propiedades plasmónicas altamente eficaces para la detección y análisis de determinadas sustancias con intereses biomédicos y medioambientales [87-90].

Sorprendentemente, la mayoría de los trabajos publicados hasta el momento sobre nanosistemas formados por nanoestrellas metálicas se han desarrollado empleando el oro como soporte metálico (NSAu). Sin embargo, la plata no se ha empleado hasta la fecha en la producción de nanoestrellas de plata (NSAg). Una excepción de esto es el trabajo publicado por Camargo y col. donde fabrican NPs de plata ramificadas, aunque con formas distantes de lo que puede considerarse como nanoestrella [91]. La fabricación de nanoestrellas de Ag podría tener un gran interés en espectroscopía y por ende en el campo de la detección óptica debido a que este metal presenta mejores propiedades ópticas que el oro, desde el punto de vista de las propiedades LSPR de ambos metales. En general, las NPs de Ag presentan actividad óptica en una amplia

región del campo EM, abarcando desde el azul hasta el infrarrojo cercano (NIR), mientras que las NPs de Au muestran actividad LSPR solo en la región del rojo-NIR. Además, las NPs de Ag manifiestan mayores factores de intensificación (F_I) comparadas con las NPs de Au. Por otra parte, los métodos más utilizados para preparar NSAu generalmente requiere del uso de surfactantes que se quedan adsorbidos sobre la superficie de las NS y limitan seriamente las aplicaciones espectroscópicas SERS de estos sistemas [92, 93]. Uno de los objetivos que se propone en la presente Tesis es la fabricación de nanoestrellas de plata mediante un método simple y que no aporta residuos contaminantes al medioambiente, o sea, utilizando un método compatible con la química verde [94, 95].

2.4.4.2 Nanoestrellas huecas

Sin duda, otro tipo de nanoestructura que ha suscitado un enorme interés en los últimos tiempos son las NPs huecas. Estos complejos sistemas nanoestructurados son capaces de mostrar propiedades plasmónicas que se pueden aprovechar en aplicaciones catalíticas y biomédicas [96-98].

En particular, hasta la fecha se han publicado trabajos donde se han utilizado nanocajas de Au con propiedades plasmónicas atractivas que permiten su uso en aplicaciones teranósticas (traducción al español de la palabra inglesa *theranostic* que surge de la unión de los términos “terapia” y “diagnóstico”). Estas NPs presentan una resonancia de plasmón en la región IR cercano (NIR), lo que hace que absorban una gran cantidad de radiación en la región comprendida entre 650 y 900 nm. Esta región también se le conoce como “ventana terapéutica del tejido” debido a la baja densidad óptica del agua y la sangre en esta región espectral en comparación con la región visible del espectro EM [99]. Por lo tanto, la absorción de luz por parte de estos sistemas nanoestructurados es más eficaz, lo que daría lugar a un sobrecalentamiento del tejido en presencia de estas NPs que conduciría a procesos como la hipertermia [78, 80, 100, 101]. Las NPs huecas se han obtenido fundamentalmente mediante métodos reemplazamiento galvánico [96, 102]. Sin embargo, todavía no se ha encontrado en la literatura nanoestrellas huecas como un sistema que combine las propiedades de intensificación plasmónica con las ventajas teranósticas. El enorme interés en la fabricación y aplicación de NPs huecas justifica el que se desarrollen nuevos métodos

de síntesis de NPs con morfologías y composiciones adecuadas que den lugar a propiedades plasmónicas interesantes. En ese sentido en esta Tesis se presentan métodos de preparación de NPs con forma de nanoestrellas huecas y naturaleza bimetalica en las que se combinan todos estos fenómenos.

2.5 PROPIEDADES SUPERFICIALES DE COLOIDES DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS

Los coloides compuestos por nanopartículas metálicas se han venido empleando frecuentemente durante en los últimos años en espectroscopía SERS debido a las propiedades ópticas y electroquímicas específicas que presentan los mismos. Sin embargo, hay un relativo desconocimiento acerca de los fenómenos que manifiestan estas partículas, tales como su agregación a través de partículas con estructuras fractales [103] y las posibles interacciones químicas que se pueden producir en su superficie [104], asociadas a procesos de adsorción, las cuales están íntimamente ligadas al método empleado para su obtención. Hay que tener en cuenta que lo primero que se encuentra una molécula al interactuar con una nanopartícula es su superficie, por lo que las características físico-químicas que describan esta superficie serán las que controlen el mecanismo de interacción metal-adsorbato.

En la preparación de sistemas coloidales con diferentes aplicaciones una cuestión de máxima importancia es la posibilidad de controlar la forma y el tamaño de las nanopartículas obtenidas, ya que las propiedades optoelectrónicas que de ellas se deriven dependen íntimamente de aquellos parámetros. Las partículas coloidales en suspensión tienen el problema de su gran inestabilidad. Son sistemas inestables que tienden a precipitar con el tiempo. A la hora de preparar coloides metálicos, se debe prestar especial atención a la estabilización de los mismos mediante diferentes medios [105].

Las NPs metálicas presentan una interfase con cargas positivas en su mayoría, debidas a una deficiencia de electrones en los átomos de la superficie que pasan al medio que las circunda, como se muestra en la fig. 2.5a. Esta carga es neutralizada por iones negativos, normalmente procedentes de las sales empleadas en la preparación del coloide. Se forma entonces una doble capa eléctrica que da lugar a la llamada capa de Stern (fig. 2.5a), integrada por iones rígidamente unidos a la superficie del metal. A

continuación se encuentra la capa de difusión, en la que los iones presentan una mayor movilidad. Como consecuencia de la distribución de cargas positivas y negativas sobre la superficie, la partícula metálica presenta una carga neta negativa. La carga residual del metal en su superficie es una propiedad importante que asegura la estabilidad de las partículas metálicas en suspensión. El potencial eléctrico en la superficie (Ψ_0) es difícil de determinar. Sin embargo es más fácil determinar el potencial en la interfase entre la capa de Stern y la de difusión, el cual recibe el nombre de potencial zeta (ζ). Este potencial es más empleado ya que del valor del mismo dependen buena parte de las propiedades físico-químicas de las nanopartículas, tales como su movilidad, difusibilidad y estabilidad [105].

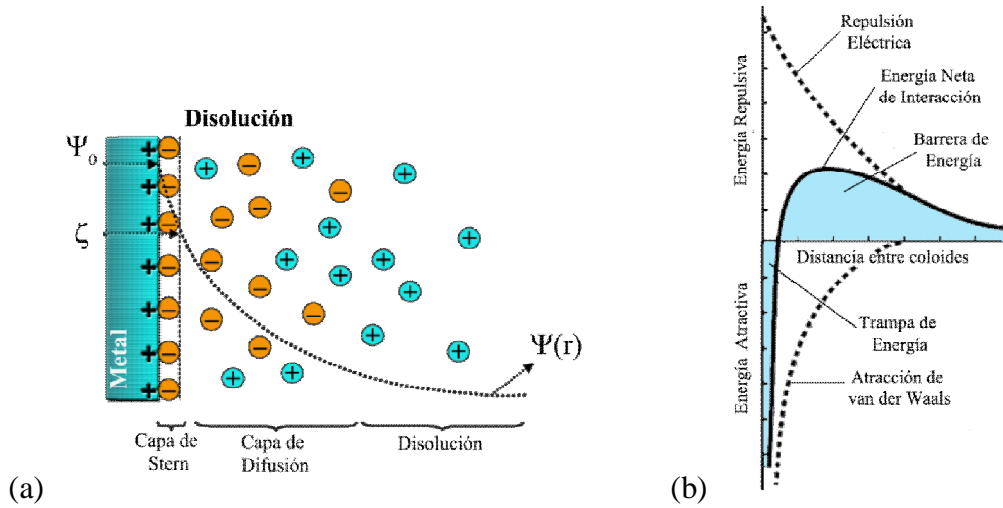


Figura 2.5: (a) Distribución de iones sobre la superficie de la nanopartícula metálica y curva de potencial eléctrico (Ψ) en función de la distancia a la superficie (Ψ_0 es el potencial eléctrico en la superficie metálica y ζ es el potencial zeta en la capa de Stern). (b) Fuerzas de atracción y repulsión entre nanopartículas (teoría DVLO) [105].

La estabilidad de estos sistemas está gobernada por un balance entre fuerzas atractivas, de tipo van der Waals y fuerzas repulsivas electrostáticas entre nanopartículas cargadas eléctricamente según describe la teoría DLVO (**D**eryagin-**L**andau-**V**erway-**O**verbeek) (ver fig. 2.5b). Las fuerzas electrostáticas de repulsión entre partículas dependen de la distancia según $1/r^2$, mientras que las fuerzas de atracción son de mucho menor alcance, ya que dependen de $1/r^6$. Del balance entre ellas resulta una curva, como se muestra en la fig. 2.5b, con un máximo correspondiente a la barrera de potencial que las partículas han de vencer para poder aproximarse lo suficiente como

para adherirse y agregarse entre ellas. La barrera energética depende del potencial ζ de las nanopartículas [106-109].

La barrera energética depende del potencial ζ de las NPs. Cuando el valor absoluto del potencial es superior a 50 mV, la suspensión coloidal es muy estable debido a las repulsiones electrostáticas, mientras que cuando baja el potencial hasta valores cercanos a cero, la coagulación es rápida con la formación de sedimentos. Incluso cuando la densidad de carga superficial es alta pero el potencial ζ es bajo, los coloides son inestables.

La reducción en el potencial ζ puede inducirse por diferentes factores: i) adsorción de una molécula neutra sobre el metal, ii) neutralización de la carga residual de la partícula o iii) por otros métodos. Esto da lugar a la consiguiente reducción de la barrera de potencial y a la agregación de las partículas. Por otra parte, la agregación puede tener lugar a través de distintos mecanismos, conduciendo a morfologías y, por lo tanto, propiedades ópticas también diferentes.

- *Agregación de coloides de nanopartículas metálicas*

La agregación coloidal se puede considerar como un modelo ideal para el estudio de procesos de crecimiento y formación de estructuras. En estos procesos, subunidades de menor tamaño se acercan debido al movimiento difusivo para luego unirse y formar agregados de tamaño mayor. En muchas ocasiones los coloides se agregan al añadir una molécula, pero en varias ocasiones es necesario inducir dicho efecto mediante la adición de agentes de agregación (en la mayoría sales inorgánicas), que actúan reduciendo la carga eléctrica en el metal al desplazar los iones débilmente adsorbidos sobre la superficie de las NPs. De esta manera, se reduce la fuerza de repulsión entre ellas, posibilitando su acercamiento para formar así agregados [105, 110, 111].

La velocidad de agregación depende no solo de la probabilidad de colisión entre dos partículas sino también de la probabilidad para la formación de una unión estable entre ellos. Existen diferentes mecanismos de agregación descritos dependiendo de las condiciones experimentales. Así, el régimen de agregación controlada por difusión (DLCA, del inglés *Diffusion-Limited Colloid Aggregation*), se produce cuando la concentración de adsorbato es elevada, ya que la densidad de carga se reduce considerablemente resultando agregados con morfologías más globulares.

Una muestra coloidal agrega en el régimen de agregación controlada por reacción (RLCA, del inglés *Reaction-Limited Colloid Aggregation*) cuando la probabilidad de unión es mucho menor que la unidad. Por ello, cuando la concentración del adsorbato en baja la agregación de las NPs en el coloide está controlada por la adhesión entre las mismas y prevalece el mecanismo de agregación RLCA. En este caso la carga residual es todavía elevada dando lugar a agregados con morfologías más lineales [105].

Los mecanismos de agregación de los coloides determinan la forma y el tamaño de los agregados resultantes. La caracterización de estos sistemas se puede realizar mediante espectroscopías ópticas (espectrofotometría UV-visible) y electrónicas (microscopía electrónica de transmisión y barrido, TEM y SEM respectivamente). Los espectros de extinción obtenidos utilizando el espectrofotómetro UV-visible, permiten conocer la posición de la resonancia de los plasmones de las NPs metálicas, que a su vez están estrechamente relacionados con el tamaño y morfología de las mismas. Los mecanismos de agregación de los coloides pueden también deducirse de los cambios observados en los espectros de extinción. Cuando se produce la agregación de las NPs metálicas, la banda de extinción debida a la presencia del plasmón de las NPs aisladas o plasmones transversales de agregados lineales (Banda *L*), decrece, a medida que surge una nueva banda a mayores longitudes de onda, asignada a los plasmones transversales (banda *T*) de las NPs metálicas agregadas. La posición de esta segunda banda está estrechamente relacionada con el mecanismo de agregación que prevalece en el sistema [105]. Desde el punto de vista de la espectroscopía SERS la banda *T* resulta ser mucho más activa ya que se considera relacionada con agregados en los que existe un número considerable de *hot spots*.

2.6 ADSORCIÓN MOLECULAR SOBRE SUPERFICIES

Como se ha mencionado anteriormente, la técnica SERS es de corto alcance, debido a las reglas de selección que describen dicho fenómeno, de 1-10 nm la distancia entre el adsorbato y la superficie metálica. Por lo tanto, para que el espectro Raman de una molécula experimente una intensificación mediante SERS es necesario que la misma se encuentre a una corta distancia de la superficie que se utilice como sustrato [112]. Es por ello que el proceso de adsorción molecular es de gran importancia para que se dé el

fenómeno SERS. Asimismo, del análisis de los espectros SERS es posible inferir información acerca de la adsorción y el mecanismo de interacción adsorbato-metal.

2.6.1 Modelos de adsorción

La adsorción es el fenómeno de concentración (depósito) de una sustancia (adsorbato o soluto) sobre la superficie de un sólido o un líquido (adsorbente). Extrapolando las situaciones al caso que interesa en esta Tesis, asumimos como adsorbato o analito a la molécula en disolución acuosa que se estudiará y como adsorbente las NPs metálicas en suspensión acuosa (coloide). La adsorción se debe a la presencia de fuerzas intermoleculares sin balancear, de los átomos o moléculas que se encuentran en la superficie de un sólido (interfase), por lo cual atraen a las moléculas de otras sustancias con las que se ponen en contacto, equilibrando de esta manera las fuerzas atractivas y disminuyendo la energía superficial.

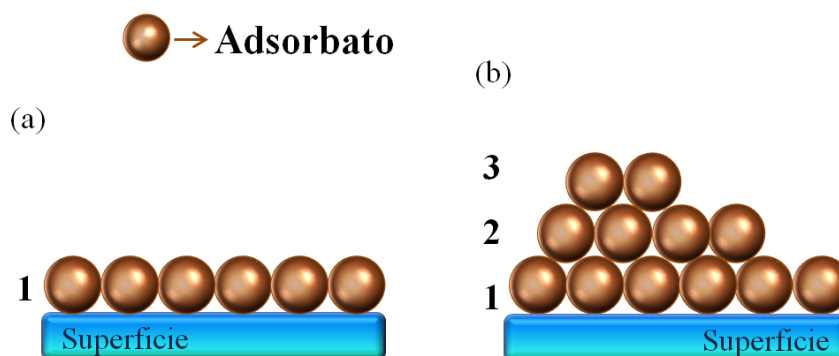


Figura 2.6: Modelos de adsorción de moléculas en una superficie: (a) adsorción de una monocapa sobre la superficie (tipo Langmuir) y (b) adsorción en multicapas sobre la superficie (tipo B.E.T.).

Existen varios modelos teóricos que describen la adsorción del analito sobre el adsorbente como un equilibrio entre especies adsorbidas y desorbidas, siendo el más sencillo el que supone la formación de una monocapa de adsorbato sobre la superficie cuando la interacción entre las moléculas del mismo es despreciable, ver la fig. 2.6a [113]. Este modelo fue formulado por Irving Langmuir en el año 1916 y fue el descubrimiento que le permitió en el año 1932 obtener el Premio Nobel de Química.

La adsorción de una molécula sobre una superficie tiene lugar en dos pasos:

1. Difusión de la molécula desde el seno de la disolución hasta la interfase.

2. Adsorción en la superficie por interacción electrostática (fisisorción) o por formación de un enlace químico (quimisorción).

La cinética de un proceso de adsorción estará controlada por el proceso más lento de entre éstos. A bajas concentraciones, generalmente el factor limitante será la velocidad de difusión de la molécula en la disolución. A elevadas concentraciones, la difusión hacia la interfase es más probable y entonces la adsorción está condicionada por la energía de interacción entre adsorbato y superficie.

El proceso de adsorción puede considerarse como un equilibrio químico entre la especie adsorbida y la libre:



Siendo A el adsorbato y S un sitio libre en la superficie y AS el adsorbato sobre la superficie. Este equilibrio está gobernado por la constante de adsorción (K_{ad}) de tal forma que cuando la interacción entre la molécula y la superficie está termodinámicamente muy favorecida el equilibrio se desplaza hacia la derecha y un mayor número de moléculas son adsorbidas en la superficie, y viceversa. En el modelo de Langmuir, este proceso continúa hasta que la superficie está recubierta completamente por una monocapa de la molécula, que es cuando se alcanza una saturación (fig. 2.7I). Dicho modelo implica la ausencia de interacción entre moléculas adsorbidas, y no es aplicable en todos los casos.

La isoterma de Langmuir fue el primer modelo importante que trató de interpretar el proceso de adsorción. La isoterma BET, cuyo nombre deriva de las iniciales de los apellidos de sus autores: **B**runauer, **E**mmet y **T**eller, responde a un modelo semejante al de Langmuir extendido a una adsorción en multicapas (ver fig. 2.6b). Este modelo fue propuesto en 1938 por los autores mencionados con anterioridad y postula que las moléculas además de con la superficie, son capaces de interaccionar entre ellas dando lugar a la formación de sucesivas capas [114]. La isoterma de BET que es la que se aplica con más frecuencia se reduce a la isoterma de Langmuir cuando el límite de adsorción es una monocapa [115]. En este modelo, además se supone que una capa determinada no necesita completarse para que se inicien las capas siguientes, por tanto la condición de equilibrio implicará varios tipos de superficies en el sentido de capas moleculares en cada recinto superficial.

En general se tiene que la adsorción aumenta con la concentración de la molécula en el medio. Los modelos de adsorción propuestos hasta la fecha predicen también una variación con la temperatura del medio, por lo que las curvas que describen la variación de la concentración superficial (ϕ , en mol/cm²) con la concentración en disolución ($[A]$, en mol/L) se refieren a una temperatura constante y, por ello, son denominadas isotermas.

$$\theta = \phi / \phi_0 = \frac{K_{ad}[A]}{1 + K_{ad}[A]} \quad (2.11)$$

La isoterma de Langmuir está bien definida y depende exclusivamente de una constante de interacción, la K_{ad} . Su forma más sencilla permite la obtención de la fracción de recubrimiento (θ), de la superficie, que es la relación entre la concentración superficial y la concentración de saturación ϕ_0 que viene dada por la ecuación 2.11:

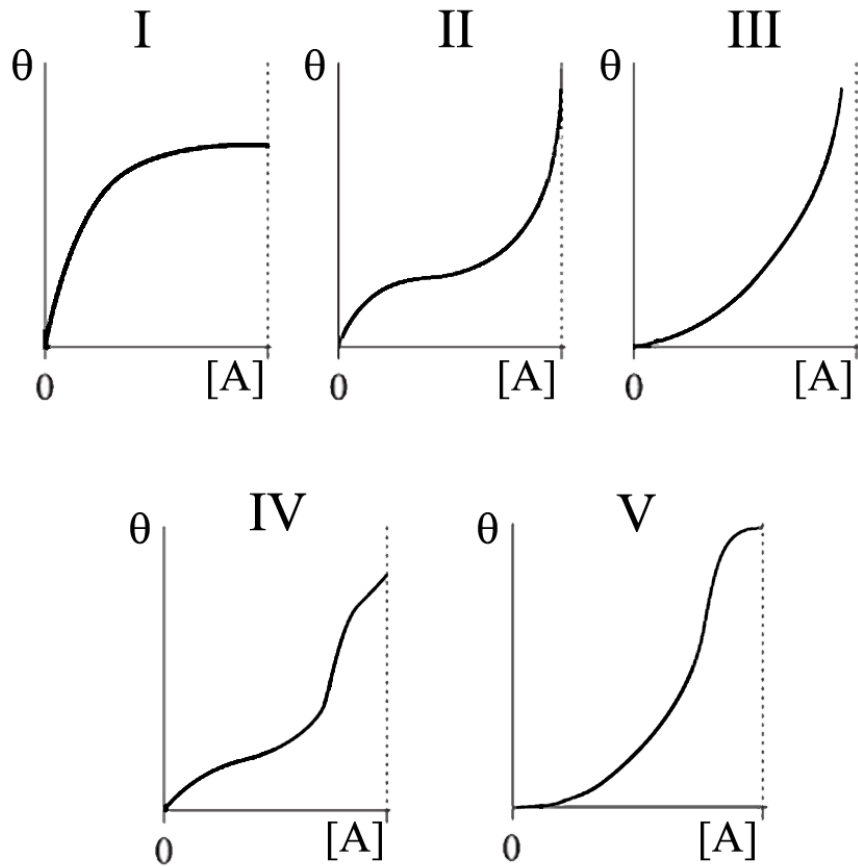


Figura 2.7: Tipos de isotermas de adsorción del adsorbato sobre una superficie. I-isoterma de Langmuir y II-isoterma de BET para diferentes tipos de interacción adsorbato-superficie diferente a Langmuir. $[A]$ -concentración del adsorbato y θ -fracción de recubrimiento.

Por otra parte, el mecanismo de adsorción tipo BET contempla dos constantes de interacción: la constante de adsorción (K_{ad}) y una segunda constante (K_2) que es producto de la interacción de las moléculas de adsorbato entre sí, dando lugar a la formación de las multicapas. En función de las proporciones entre K_{ad} y K_2 , pueden encontrarse cinco tipos de isothermas de adsorción diferentes, que se muestran en la fig. 2.7.

- Caso I: Isotherma de Langmuir (K_{ad})
- Caso II: Isotherma BET, saturación de la monocapa y formación de posteriores capas ($K_{ad} \gg K_2$)
- Caso III: las capas posteriores empiezan a formarse antes de la formación de la monocapa ($K_{ad} \ll K_2$)
- Caso IV: Tipo II con saturación (no se generan infinitas capas). Muy poco probable
- Caso V: Tipo III con saturación ($K_{ad} \approx K_2$)

La adsorción directa de una molécula sobre una superficie plasmónica sólo es posible cuando la molécula presenta algún tipo de afinidad por el metal, debido a la presencia en su estructura de grupos funcionales afines a los metales plasmónicos, favoreciendo su adsorción mediante una interacción electrostática o covalente.

2.7 APLICACIÓN DE LA TÉCNICA SERS AL ESTUDIO DE BIOMOLÉCULAS

Recientemente se le ha prestado especial atención a la técnica SERS desde un punto de vista analítico potencialmente adecuado para la detección de biomoléculas debido a las ventajas propias de la técnica sobre otras variantes alternativas [71, 116-118]. La interacción de biomoléculas, en especial péptidos y proteínas, con nanopartículas metálicas resulta un tema de gran interés en la biomedicina y la nanotecnología. Las nanopartículas metálicas se han utilizado como plataformas especiales para obtener nanomateriales híbridos con propiedades tanto orgánicas como inorgánicas [118, 119]. Estos materiales híbridos se han obtenido mediante la funcionalización de la superficie metálica con diferentes moléculas de origen biológico y farmacéutico [119-121]. A principios de los años 80's varios grupos comenzaron a estudiar diferentes tipos de moléculas biológicas mediante la espectroscopía SERS, con el fin de obtener

información adicional acerca de su estructura y funcionalidad [122-124]. Estos primeros estudios estuvieron focalizados en biomoléculas como aminoácidos, proteínas de membrana y ácidos nucleicos [122, 125, 126]. Los objetivos que se planteaban en aquel entonces coinciden con los que hoy en día se buscan al estudiar un sistema complejo metal-biomolécula utilizando la técnica SERS [126]. Entre los más comunes se encuentran:

- Definir los mecanismos moleculares de la interacción de la biomolécula con la superficie del metal bajo las condiciones típicas de un experimento SERS y observar si la proteína mantiene su conformación nativa en estas circunstancias.
- Conocer la dependencia real de la sección eficaz de la intensificación Raman de la biomolécula y detectar los modos normales de vibración de los grupos funcionales que se encuentren en contacto con la superficie metálica.
- Detectar bajas concentraciones de las biomoléculas a partir de los espectros SERS de las mismas, manteniendo una alta calidad en los espectros SERS.

El desarrollo de nanopartículas biocompatibles con aplicaciones en el área de imagen molecular *in vivo* y tratamiento dirigido es un campo que está adquiriendo un notable interés en múltiples disciplinas como ciencia, ingeniería y biomedicina. Cuando se conjugan las NPs con ligandos biomoleculares dirigidos, como anticuerpos monoclonales, péptidos o pequeñas moléculas, estos sistemas se pueden utilizar para tratar tumores malignos con alta especificidad y afinidad [127-130].

La hipertermia terapéutica se ha venido utilizando para el tratamiento del cáncer desde hace años. Esta técnica consiste en elevar la temperatura hasta $> 42^{\circ}\text{C}$ para matar células malignas a través de la muerte celular ya sea por apoptosis o necrosis. Actualmente se han realizado varios estudios sobre el desarrollo de diferentes tipos de agentes de terapia fototérmica para el tratamiento de tumores por hipertermia. La principal características de estos agentes terapéuticos fototérmicos es que presentan plasmones intensificados que absorben en la región del IR-cercano (NIR), como pueden ser NPs de Au de diversas morfologías (nanoesferas, NPs de oro recubiertas con sílica, nanovarillas, nanocajas, nanocubos, nanopartículas huecas y nanopartículas ramificadas) [78, 131, 132]. En especial, las nanoestrellas presentan una morfología donde abundan las ramas o brazos puntiagudos con plasmones que se pueden ajustar fácilmente. Estos sistemas han despertado gran interés en el ámbito de la biomedicina.

Normalmente las NPs metálicas son difíciles de visualizar ópticamente. Sin embargo las nanoestrellas generan eficientes LSPR que ofrecen un gran contraste mediante la técnica de microscopía multifotónica [78]. Otra de las aplicaciones prometedoras que se han investigado en la última década, y que involucra a las nanoestrellas, es la bio-detección altamente sensible de diferentes sistemas moleculares [133, 134].

En la presente Tesis se han estudiado dos moléculas marcadoras de agregados amiloideos o también conocidos como colorantes histológicos: Rojo Congo y tioflavina T. Asimismo, también se investigado la adsorción de tres péptidos que presentan la característica de formar fibrillas como el lanreótido y el pasireótido (también llamado SOM230). Además del fragmento de beta amiloide 25-35 (βAm_{25-35}), que se caracteriza por formar agregados amiloideos. Estos estudios se han encaminado hacia el diseño de métodos de diagnóstico basados en dos tipos de estrategia distinta: a) diagnóstico indirecto, en el que se analiza un marcador histológico con una señal SERS más intensa; y b) diagnóstico directo, basado en el estudio directo del péptido. Esta última estrategia implica un profundo estudio en la optimización de los soportes plasmónicos por tratarse de biomoléculas con una menor actividad SERS.

2.7.1 Colorantes histológicos marcadores de agregados amiloideos

Los colorantes y tinturas son sustancias que normalmente se utilizan en biología y medicina para resaltar estructuras en tejidos biológicos que van a ser observados con la ayuda de diferentes tipos de microscopios. Por lo general, los colorantes son hidrosolubles y se caracterizan por unirse a determinadas moléculas presentes en los tejidos gracias a afinidades químicas [135, 136].

El Rojo Congo (CR) y la tioflavina T (ThT), ver fig. 2.8 (a y b, respectivamente), son pigmentos histológicos que tienen una alta afinidad por el péptido de β -amiloide (βAm), es por ello que se utilizan con frecuencia para teñir agregados de βAm . El mecanismo de interacción de CR con fibrillas de amiloide no está bien definido aún. Sin embargo, se cree que la unión CR-agregado depende de la configuración secundaria de la fibrilla, que consiste predominantemente en hojas β -plisada cruzadas. La estructura de CR sugiere que la unión podría ocurrir a través de una combinación de interacciones hidrófobas de los centros e interacciones electrostáticas que implican los grupos terminales cargados bi-bencidina. Probablemente dos cargas negativas procedentes de

los grupos sulfato en el CR, y dos aminoácidos con residuos cargados positivamente en dos protofilamentos separados permiten esta interacción [137].

Además, se ha descubierto que este colorante tiene la capacidad de interferir en el proceso de agregación y plegamiento proteico, estabilizando el monómero nativo de la proteína o el intermediario parcialmente plegado, a través de la reducción de la concentración de oligómeros proteicos tóxicos. Particularmente, el Rojo Congo exhibe efectos positivos en modelos de desórdenes en enfermedades neurodegenerativas como, Alzheimer, Parkinson, prion y Huntington. Otra aplicación de este colorante es en el desarrollo de sondas de imagen [137, 138].

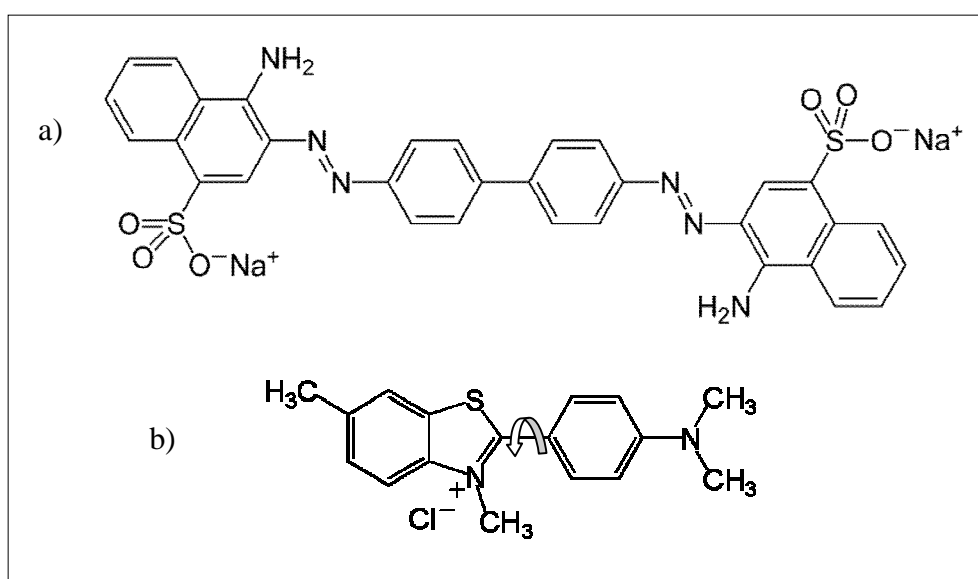


Figura 2.8: Estructura química de las moléculas de: a) Rojo Congo y b) tioflavina T con un ángulo de torsión (ϕ) entre las mitades benzotiazol y amino-benceno (“rotor molecular”).

Por otra parte, la molécula de ThT se ha utilizado como marcador fluorescente altamente sensible en la detección de fibrillas de amiloide ampliamente utilizado en ensayos biomédicos *in vitro*, sin embargo no se conoce con exactitud el comportamiento fotofísico del complejo, ni la forma de unión con la fibrilla de amiloide [139-141]. Este colorante se puede utilizar para visualizar y cuantificar fibrillas de amiloide *in vitro* usando la espectroscopía de fluorescencia, también se utiliza para el diagnóstico de amiloidosis en secciones de tejidos mediante la microscopía de fluorescencia [140, 142]. Al unirse la ThT con las fibrillas de amiloide aumenta la fluorescencia del complejo con respecto a la de la molécula libre en disolución y esta es la propiedad más estudiada de la ThT. Este aumento dramático de la fluorescencia de la ThT puede estar

relacionado con la inmovilización selectiva de un subconjunto de conformeros de ThT [139]. Las predicciones de los cálculos mecano-cuánticos y los resultados experimentales sugieren que la molécula de ThT se comporta como un “rotor molecular”. La forma iónica de ThT en disolución presenta una libre rotación alrededor del enlace C-C de las mitades benzotiazol y amino-benceno señalado con una flecha en la fig. 2.8b. En estas condiciones, la molécula de ThT prefiere una conformación no-plana cuando se encuentra no-enlazada, con un ángulo de torsión (φ) de $\sim 37^\circ$ formado por los dos sistemas aromáticos que componen la estructura de la molécula, tal como predicen los cálculos mecano-cuánticos [142-144]. Bajo esta última conformación se produce una conjugación de los electrones π de los sistemas aromáticos, lo cual produce un *quenching* de la fluorescencia debido a la rotación de las dos partes de la molécula, lo que conduce a una rápida desexcitación y a una fuerte disminución de la emisión fluorescente. Sin embargo, cuando la molécula se encuentra en un entorno apolar o unida a una estructura como pueden ser las fibrillas de amiloide, el ángulo de torsión cambia alcanzando una conformación de 90° entre las dos partes aromáticas. Este cambio estructural produce una pérdida de la conjugación y un bloqueo del enlace C-C, lo cual implica un aumento en la fluorescencia de la ThT [139, 144].

La aplicación de la técnica SERS de los colorantes histológicos CR y ThT, no se ha estudiado hasta la fecha. El SERS podría permitir una detección mucho más sensible de estos colorantes gracias a la intensificación por LSPR, lo que abre interesantes perspectivas en cuanto a una posible fabricación y aplicación de sistema de detección de agregados amiloides basados en el uso de estos colorantes como adsorbato SERS en un posible biónico diagnóstico de tipo indirecto.

2.7.2 Péptidos fibrogénicos

El lanreótido (LAN) y el pasireótido o SOM230 son péptidos sintéticos análogos a la somatostatina (SST), utilizados en el tratamiento de la acromegalia y tumores neuroendocrinos debido a que su acción prolongada en el organismo [145-148]. Estos péptidos se caracterizan por su capacidad de formar fibrillas bajo determinadas condiciones fisiológicas [147, 149-151]. El lanreótido (Fig. 2.9a) es un péptido compuesto por ocho aminoácidos sintetizado como un inhibidor de la hormona de crecimiento. Este péptido es capaz de formar un hidrogel que se ha utilizado en el

tratamiento de la acromegalia en forma de implantes de larga duración por vía subcutánea [147, 152].

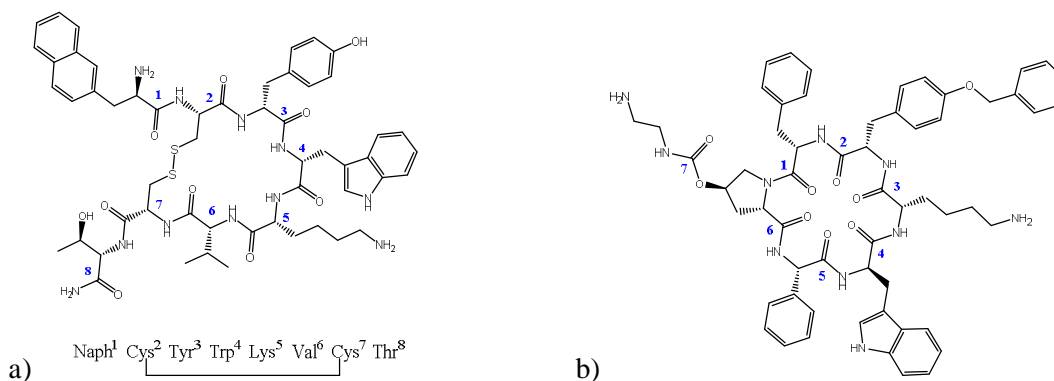


Figura 2.9: Estructura química de los péptidos estudiados: Lanreótido (a) y Pasireótido (b).

El grupo liderado por Paternostre ha estudiado en profundidad la formación molecular y macromolecular del autoensamblaje de nanotubos que forma el péptido lanreótido mediante diferentes técnicas como la microscopía electrónica, la microscopía de luz polarizada, espectroscopía vibracional y dispersión de rayos X en ángulos bajo y altos (SAXS y WAXS, respectivamente) [147, 149]. Se ha demostrado que las concentraciones de péptido requeridas para este tipo de experimento son muy elevadas: del orden de mili-molar.

El pasireótido o péptido SOM230 (fig. 2.9b) es un ligando multi-receptor análogo de la somatostatina con una alta afinidad de unión a receptores de la somatostatina subtipo SST_{1,2,3} y SST₅. Sin embargo, el péptido SOM230, no ha sido estudiado desde un punto de vista físico-químico en la literatura. La mayoría de los trabajos publicados hasta el momento relacionados con el SOM230 se deben a estudios derivados de su acción terapéutica en el organismo como consecuencia del tratamiento de determinadas enfermedades como la acromegalia, la enfermedad de Cushing's y algunos tumores carcinoides [153-156]. Es por ello que en la presente Tesis se ha realizado un estudio físico-químico del SOM230 mediante diferentes técnicas de caracterización como la microscopía electrónica de transmisión, la espectroscopía vibracional Raman y la técnica de SERS.

2.7.3 Péptidos formadores de agregados amiloideos

El término amiloidosis se refiere a un grupo de enfermedades causada por el mal plegamiento de proteínas que se acumulan en diferentes tejidos y órganos, provocando que los mismos no funcionen correctamente. Estas proteínas forman agregados insolubles llamados fibras amiloideas, las cuales se caracterizan por presentar una morfología de fibrillas con estructuras ricas en la conformación de láminas- β [140].

Varios autores han demostrado que los fragmentos del péptido β Am 1-42 y 1-40 presentan una alta hidrofobicidad. El carácter hidrófobo del β Am₁₋₄₂ es ligeramente mayor que el β Am₁₋₄₀ [157, 158], debido a sus dos aminoácidos adicionales (Ile y Ala), (fig. 2.10a). La estructura secundaria para cada fragmento de β Am varía en dependencia de las condiciones en las que se encuentre [159, 160]. Serpell resume en un trabajo publicado en el año 2000 una tabla con algunos de los principales fragmentos que conforman el péptido de β Am y sus estructuras/conformaciones mediante diferentes técnicas de análisis estructural [161].

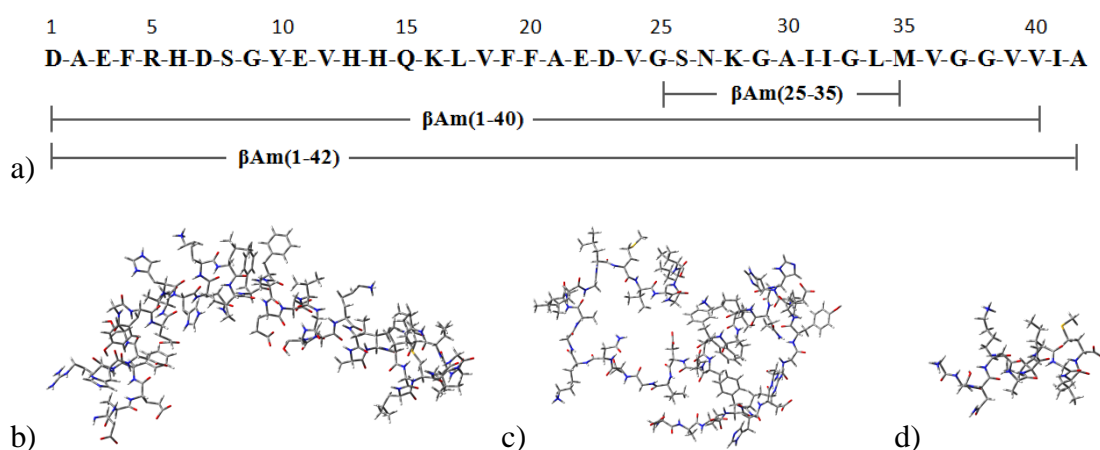


Figura 2.10: (a) Secuencia de los aminoácidos en código de una letra del péptido β -Amilode. Estructura tridimensional obtenida de la RCSB Protein Data Bank para los tres fragmentos de β -Amilode utilizados y visualizadas con GaussView 5.0: (b) β Am₁₋₄₂ [162], (c) β Am₁₋₄₀ [163] y (d) β Am₂₅₋₃₅ [164].

El otro fragmento que se estudió en esta tesis fue el β Am₂₅₋₃₅ (fig. 2.10 a y d) pues se ha podido constatar su clara implicación en la formación de agregados amiloideos, a pesar de su pequeño tamaño. Este péptido resulta ser el fragmento más corto que mantiene su actividad [165] en cuanto a neurotoxicidad [166, 167].

La actividad del péptido βAm_{25-35} hace que este péptido se haya encontrado en las placas seniles y en la degeneración de neuronas del hipocampo presente en pacientes con la enfermedad de Alzheimer y ausente en sujetos sanos utilizados como control [168]. Ello es así porque ciertas formas del βAm_{1-40} se pueden convertir a la forma βAm_{25-35} por la acción de proteasas cerebrales [168, 169]. Este hecho ha llevado a pensar que el dominio funcional (secuencia GSNKGAIIGLM, fig. 2.10d) de la proteína precursora de β -Amiloide, y que constituye la secuencia del péptido βAm_{25-35} contiene la secuencia requerida para inducir los cambios estructurales que generan los efectos neurotróficos en tejidos neuronales normales, así como los efectos neurotóxicos en pacientes con la enfermedad de Alzheimer [170, 171]. Es por ello que en trabajos anteriores se ha utilizado este péptido (βAm_{25-35}) como modelo del de tamaño completo (βAm_{1-42}) en estudios estructurales y funcionales [172].

Las concentraciones de los péptidos descritos anteriormente que se requieren para que los procesos de fibrilación tengan lugar son muy elevadas (del orden de 10^{-3} mol/L). Sin embargo, el gran poder de detección de las NPs plasmónicas en el SERS permite la detección de muy bajas concentraciones del adsorbato [173, 174]. Este hecho podría ser empleado en el estudio de posibles procesos de fibrilación sobre las nanopartículas a concentraciones bajas. Además, los procesos de adsorción molecular sobre NPs provocan un efecto concentrador de los péptidos adsorbidos sobre ellas. Por lo tanto, el uso de NPs plasmónicas podrían simular los procesos reales que tienen lugar en sistemas biológicos reales existentes en los tejidos vivos, en donde los péptidos fibrilan a bajas concentraciones por aumento local de la concentración basado en el depósito o adsorción de estos péptidos sobre determinadas superficies.

Es por ello que en esta Tesis se pretende estudiar la influencia de las NPs en la formación de agregados de los péptidos anteriormente mencionados, así como las prestaciones de la técnica SERS en la caracterización y determinación del mecanismo de interacción péptido-NP metálica.

3. Objetivos

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Esta Tesis tiene como objetivo general la fabricación de materiales anisotrópicos con naturaleza plasmónica y forma de estrella para ser utilizados como sustratos SERS, así como su caracterización físico-química y la aplicación de nanopartículas plasmónicas (en general) en la caracterización estructural y la adsorción de sistemas biológicos (concretamente los colorantes histológicos marcadores de agregados amiloideos Rojo Congo y tioflavina T, y una serie de diferentes péptidos fibrógenos) en procesos de fibrilación, adsorción y biofuncionalización de nanopartículas con vistas a aplicaciones de tipo terapéutico, reparto de fármacos o biodiagnóstico.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Fabricación de nanopartículas de plata con forma de estrella (NSAg) mediante métodos que implican la utilización de procesos de crecimiento en dos pasos empleando hidroxilamina neutra y citrato.
2. Optimización de los diferentes factores experimentales que influyen en la fabricación de las NSAg, tales como concentración de Ag^+ , concentración de los reductores y el lapso de tiempo entre las reducciones consecutivas.
3. Fabricación de nanoestrellas huecas bimetálicas, con una corteza compuesta por una aleación de Ag y Au, mediante el método de reemplazamiento galvánico y utilizando como semilla las NS fabricadas en el objetivo anterior.
4. Caracterización de los sistemas obtenidos en los objetivos 1 y 3 mediante diferentes técnicas físico-químicas: resonancia de plasmón en espectros de extinción, microscopía electrónica, microscopía de campo oscuro y espectroscopía SERS.
5. Análisis de la efectividad SERS de las nanoestrellas obtenidas en los objetivos 1 y 3 usando los colorantes histológicos marcadores de agregados amiloideos Rojo Congo y la tioflavina T. Investigación de la adsorción de estos colorantes mediante la

obtención de las correspondientes isothermas de adsorción y deducción de los parámetros de la adsorción (constante de adsorción y límite de detección).

6. Estudio estructural de los péptidos fibrogénicos lanreótido, pasireótido y tres fragmentos diferentes del péptido de β -Amiloide (βAm_{25-35} , βAm_{1-42} y βAm_{1-40}) mediante Raman normal y SERS. Investigación de su adsorción sobre nanopartículas plasmónicas variando las condiciones experimentales. Deducción del mecanismo de interacción entre el péptido fibrogénico y la superficie de la NP metálica a partir de las isothermas de adsorción y sus parámetros (constante de adsorción y límite de detección).

7. Correlación entre los resultados encontrados en el estudio de la adsorción de péptidos fibrogénicos y procesos de fibrilación a bajas concentraciones sobre nanopartículas plasmónicas e implicaciones en la posible biofuncionalización de las nanopartículas mediante péptidos.

4. Parte Experimental

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1 MATERIALES

El nitrato de plata ($\geq 99.0\%$), citrato trisódico ($\geq 98\%$), nitrato potásico (99%), hidróxido sódico (99,998%) y el clorhidrato de hidroxilamina (99%) se adquirieron de Sigma-Aldrich. La solución de hidroxilamina (50 % de peso en H_2O) se adquirió de Aldrich. El clorhidrato áurico trihidratado (99,5%) se adquirió de Merck.

La tioflavina T (4-(3,6-dimethyl-1,3-benzothiazol-3-ium-2-yl)-N,N-dimethylaniline chloride) se adquirió de Sigma. La lucigenina (N,N'-Dimethyl-9,9'-biacridinium dinitrate), el Rojo Congo (Disodium 3,3'-[[1,1'-biphenyl]-4,4'-diylbis(azo)]bis(4-aminonaphthalene-1-sulphonate)) y el tiofenol se adquirieron de Fluka. Se prepararon disoluciones acuosas de estas sustancias con una concentración final de 0.01 M, menos para el caso del tiofenol, que se preparó una disolución etanólica de 0.01 M. Posteriores diluciones acuosas se realizaron según necesidad. Las disoluciones acuosas se prepararon empleando agua MilliQ obtenida con un sistema de purificación de agua Integral 3 de Millipore. El etanol empleado era de grado analítico y se adquirió de Merck.

Los diferentes fragmentos del péptido de β -Amiloide (1-42; 1-40 y 25-35) con valores de pureza entre 90 - 97 %, se adquirieron de Sigma. Los péptidos Lanreotide en forma de sal acetilada y Pasireótido fueron adquiridos de IPSEN donde se liofilizaron y purificaron antes de ser utilizados en los experimentos.

4.2 INSTRUMENTACIÓN

Los espectros SERS se registraron empleando un espectrofotómetro Raman Renishaw InVia (fig. 4.1a) equipado como fuentes de excitación dos líneas láser a 785 y 532 nm. La línea a 785 nm fue proporcionada por un láser de diodo modelo HPNIR785, mientras que la línea a 532 nm se obtuvo a partir de un láser de Nd-YAG, que emite a 1064 nm, cuya longitud de onda se transformó a 532 nm mediante un doblador de frecuencia, modelo RL532C100. El equipo está dotado de una cámara CCD con refrigeración eléctrica. La resolución espectral fue de 2 cm^{-1} en todos los experimentos.

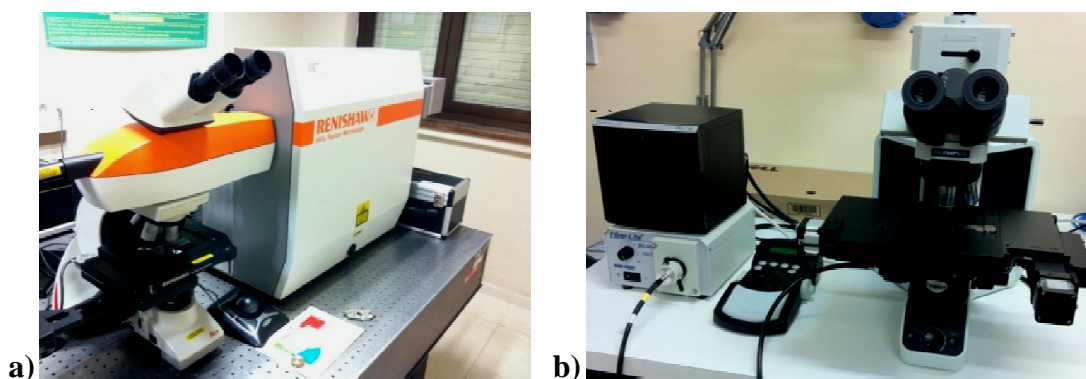


Figura 4.1: Espectrofotómetro Raman Renishaw InVia (a). Equipo CytoViva (Auburn, AL), compuesto por un microscopio Olympus de campo oscuro intensificado (EDFM) que tiene acoplado por vía de un dispositivo de fibra óptica para obtener imágenes hiperespectrales en el rango VNIR (400-1000 nm) (b).

Los espectros Raman de los compuestos puros y en disolución fueron registrados en un espectrómetro FT-Raman Bruker, modelo RFS 100/S equipado con un láser Nd-Yag de 1064 nm con un detector de Ge refrigerado con nitrógeno líquido.

Los espectros de extinción de los coloides para medida de la resonancia de plasmones se registraron en un espectrofotómetro UV-visible-NIR de doble haz Shimadzu 3600, equipado con una lámpara de deuterio y una de wolframio como fuentes de excitación y con tres detectores: un PMT para la región UV-visible y detectores InGaAs y PbS para la región del infrarrojo cercano (NIR).

Las imágenes de campo oscuro y los espectros de dispersión se registraron mediante un equipo CytoViva (Auburn, AL) (fig. 4.1b) compuesto por un microscopio Olympus (EDFM). Las medidas con este instrumento se realizaron en un laboratorio del Istituto per la Sintesi Organica e la Fotoreattività (ISOF) del Consiglio Nazionale delle

Ricerche (CNR), Bologna, Italia. El sistema consiste en un condensador de campo oscuro CytoViva 150 en lugar de un condensador de microscopio clásico, unido por una guía de fibra óptica a una fuente de excitación de walframio Solarc 24 (Welch Allyn, Skaneateles Falls, NY). Se utilizó un objetivo 100x de inmersión en aceite, provisto con un iris (Olympus UPlanAPO).

Las imágenes de microscopía electrónica de transmisión y barrido fueron obtenidas con tres microscopios electrónicos diferentes. Para las micrografías TEM se utilizaron los equipos JEOL JEM-1011 con un voltaje de aceleración de 100 kV y equipado con una cámara CCD con refrigeración electrónica y un FE-SEM Hitachi, modelo S-8000, con filamento de emisión de campo y un voltaje de aceleración de 30 kV, este equipo es un microscopio electrónico de barrido de alta resolución que permite trabajar en modo transmisión.

Las micrografías SEM realizadas a las muestras NSAg305 y NSAgAu3 se obtuvieron con un Hitachi SU-6600, con filamento de emisión de campo y un voltaje de aceleración de 30 kV, equipado con detectores de electrones secundarios y retrodispersados, además de un detector de EBSD HKL Nondlys R+ (*Electron Backscatter Diffraction Analysis*) y un sistema de microanálisis por dispersión de energía de rayos X, Oxford Instruments X-Max 20 mm², donde se obtuvieron los espectros EDX y la caracterización elemental de las nanoestrellas.

4.3 MÉTODOS

4.3.1 Fabricación de nanoestrellas de plata con propiedades plasmónicas

Recientemente se ha fabricado una gran variedad de nanopartículas metálicas anisotrópicas de diversas formas y tamaños con buenas propiedades SERS [175-177]. En este sentido, la obtención de nanoestructuras metálicas con forma de estrella representa una estrategia muy útil para inducir la intensificación del campo EM sin recurrir a la agregación del coloide. Hasta el momento sólo han sido publicados en la literatura trabajos referidos a la fabricación de nanoestrellas de oro. Estas nanopartículas se sintetizan mayoritariamente por métodos que utilizan surfactantes u otros compuestos que se adsorben en la superficie de la NP [60, 178]. Esto provoca una seria limitación para aplicaciones espectroscópicas SERS de los sistemas en cuestión, ya que los surfactantes empleados pueden enmascarar las bandas del analito estudiado.

Tabla 4.1: Condiciones experimentales para las distintas nanoestrellas de plata donde: T_1 - tiempo transcurrido entre ambas reducciones; $[Ag^+]$ - concentración de la disolución de $AgNO_3$; $[Hx]$ - concentración de la disolución de hidroxilamina 50 % v/v; $V(CT)$ - volumen de citrato trisódico (CT) 1 % p/v añadido; $[Hx]/[Ag^+]$ - relación molar entre las disoluciones de Hx y $AgNO_3$.

NSAg	105	130	160	205	230	260	305	330
T_1 (min.)	05	30	60	05	30	60	05	30
$[Ag^+] \times 10^{-3}$ (mol/L)	1,11	1,11	1,11	1,11	1,11	1,11	1,11	1,11
$[Hx] \times 10^{-2}$ (mol/L)	3,01	3,01	3,01	3,01	3,01	3,01	6,02	6,02
$[Hx]/[Ag^+]$	27	27	27	27	27	27	55	55
$V(CT)$ (μ L)	100	100	100	10	10	10	100	100
NSAg	360	405	430	460	505	530	560	605
T_1 (min.)	60	05	30	60	05	30	60	05
$[Ag^+] \times 10^{-3}$ (mol/L)	1,11	1,11	1,11	1,11	1,11	1,11	1,11	1,11
$[Hx] \times 10^{-2}$ (mol/L)	6,02	6,02	6,02	6,02	13,01	13,01	13,01	13,01
$[Hx]/[Ag^+]$	55	55	55	55	120	120	120	120
$V(CT)$ (μ L)	100	10	10	10	100	100	100	10
NSAg	630	660	705	730	760	805	830	860
T_1 (min.)	30	60	05	30	60	05	30	60
$[Ag^+] \times 10^{-3}$ (mol/L)	1,11	1,11	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11
$[Hx] \times 10^{-2}$ (mol/L)	13,01	13,01	6,02	6,02	6,02	6,02	6,02	6,02
$[Hx]/[Ag^+]$	120	120	550	550	550	550	550	550
$V(CT)$ (μ L)	10	10	100	100	100	10	10	10

La fabricación de nanopartículas metálicas con forma de estrella se realizó mediante un nuevo procedimiento de preparación basado en la reducción en dos pasos utilizando dos reductores químicos: i) disolución acuosa de hidroxilamina al 50 % v/v y ii) citrato trisódico (1 % v/v). Estos reactivos funcionan complementariamente en la reducción, crecimiento y estabilización de las nanopartículas en medio acuoso dando lugar a la formación de nanopartículas con forma de estrella.

4.3.2 Fabricación de nanoestrellas bimetálicas huecas con propiedades plasmónicas

Las nanoestrellas huecas (NSH) han demostrado en los últimos tiempos unas propiedades plasmónicas y catalíticas sobresalientes con aplicaciones prometedoras también en el mundo de la medicina [97, 98, 179]. Estas NSH se han obtenido hasta la fecha mediante el método de reemplazamiento galvánico utilizando NPs de Ag como moldes [102]. La tabla 4.2 muestra las condiciones experimentales empleadas en esta Tesis para la obtención de NSH con diferentes propiedades plasmónicas.

Tabla 4.2: Condiciones experimentales para las distintas nanoestrellas huecas bimetálicas obtenidas donde: $[Ag^+]$ - concentración de la disolución de $AgNO_3$; $[Au^{3+}]$ - concentración de la disolución de $HAuCl_4 \cdot 3H_2O$; $[Hx]$ - concentración de la disolución de hidroxilamina 50 % v/v; CT- concentración de citrato trisódico añadido; $[Ag^+]:[Au^{3+}]$ - relación molar entre las disoluciones de $AgNO_3$ y $HAuCl_4 \cdot 3H_2O$.

[Reagent] (mM)	NSAgAu1	NSAgAu2	NSAgAu3	NSAgAu4	AuNP	AuCT	AuCT ₅₀
$[Ag^+]$	0.07	0.37	0.73	0.73	0	0	0
$[Au^{3+}]$	0.27	0.27	0.27	11.68	0.40	0.20	0.20
$[Hx]$	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	0	0
CT	0.26	0.26	0.26	0.03	0.26	0.77	0.16
$[Ag^+]:[Au^{3+}]$	0.3:1	1.4:1	3:1	1:16	-	-	-
pH	5.0	5.0	4.7	4.4	4.4	5.5	5.5

En esta tesis se han obtenido nanoestrellas huecas a través del método de reemplazamiento galvánico [180-182]. Para ello se ha empleado la reducción química utilizando una mezcla de disoluciones de las sales correspondientes a la Ag^+ y el Au^{3+} , antes de llevar a cabo el reemplazamiento galvánico. Estas nanopartículas están formadas por una corteza de ambos metales en la superficie integrada por una aleación

de ambos metales (Au y Ag). La fig. 4.2 muestra el esquema propuesto para la fabricación de las NSH

Al poner en contacto la disolución de Au^{3+} con las nanoestrellas de plata, tiene lugar un reemplazamiento entre los átomos de Ag y Au, debido a las diferencias en los potenciales de reducción que presentan ambos metales [102, 180, 183]. El oro Au^{3+} que se encuentra en disolución formando parte de la sal de oro añadida ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), se reduce a Au^0 y se deposita creando una cubierta de oro sobre la superficie de la nanopartícula de plata, mientras que la plata que se encuentra en la NP experimenta una oxidación a Ag^+ y difunde hacia la disolución.

En la disolución los iones Ag^+ reaccionan con iones citrato que activados por el calor aplicado durante la segunda fase del proceso vuelve a reconvertir la plata Ag^+ a Ag^0 , ver fig. 4.2f. Los átomos de Ag se depositan posteriormente en la superficie formando así una corteza sobre las NS de Ag originales integrada por una aleación bimetálica Ag/Au, ver fig. 4.2g.

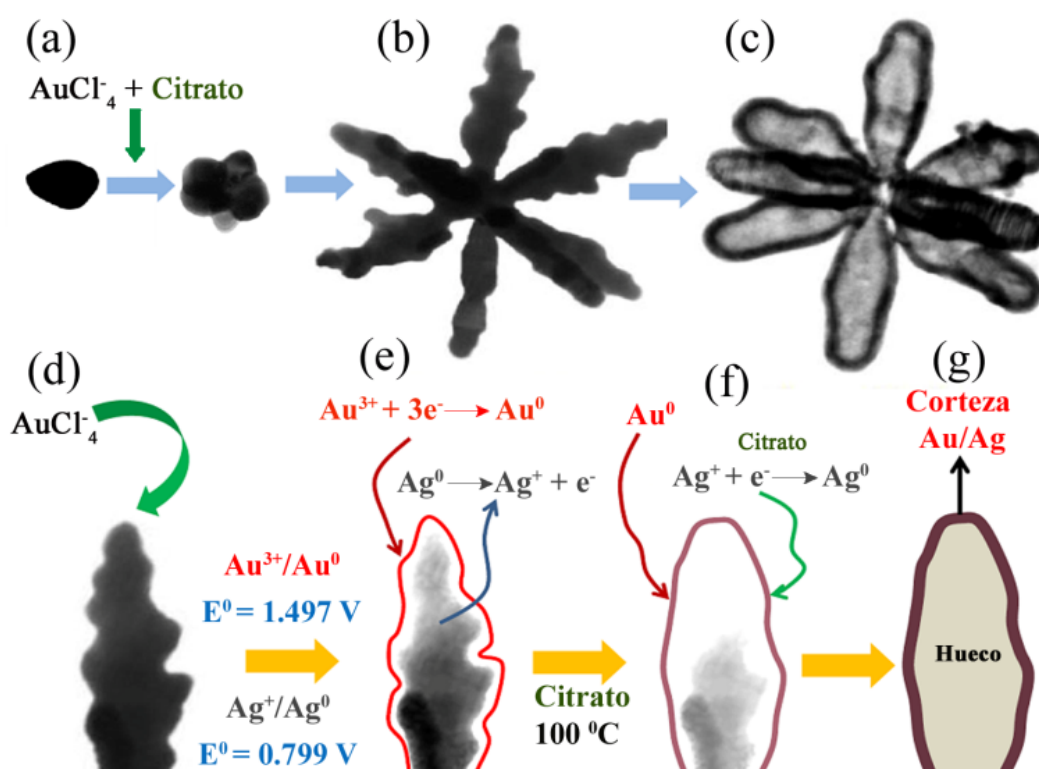


Figura 4.2: (a-c) Esquema propuesto para la formación de las NSH partiendo de las NSAg utilizadas como semilla de crecimiento, deducido a partir de las imágenes TEM realizadas para su caracterización. (d-g) Esquema propuesto para el reemplazamiento galvánico y formación de la aleación Ag/Au que ocurre en la superficie de las nanoestrellas.

La técnica SERS permite determinar la composición química de la corteza de las nanoestrellas huecas utilizando una molécula de prueba, en este caso la lucigenina que presenta diferentes mecanismos de adsorción sobre la superficie metálica de las nanopartículas en dependencia del metal con que interactúe y servirá para comprobar si ambos metales están presentes en la corteza.

4.3.3 Preparación de muestras y registro de medidas

Las muestras para espectroscopía de absorción UV-visible se diluyeron hasta un 30 % utilizando agua MilliQ, con el fin de evitar la saturación del detector. La preparación de muestras para SERS se realizó añadiendo a 1 mL de coloide una alícuota (entre 1 y 10 μL) de la molécula de interés. A pesar de que las disoluciones de los péptidos analizados agregan el coloide por sí solos, se decidió añadir una alícuota (20 μL) de disolución salina de KNO_3 (0.5 M) a un mL de coloide para obtener una mayor homogeneidad y reproducibilidad en las medidas. La agregación del coloide se realizó con el objetivo adicional de detectar concentraciones más bajas del péptido debido a que la agregación externa con una disolución acuosa de KNO_3 permite obtener NPs un mayor número de *Hot Spots* que intensifican el campo electro magnético entre NPs [74]. En todos los casos los espectros SERS se registraron a una resolución espectral de 2 cm^{-1} con un tiempo de adquisición de 10 s en cada espectro SERS y consistente en una acumulación, menos para el caso de los péptidos donde los espectros registrados consistieron en dos acumulaciones cada uno-

En el proceso de fabricación de las NSAg y las NSAuAg obtenidas en esta Tesis se añade citrato como agente reductor y estabilizante de los coloides. El CT que queda en exceso se deposita en la superficie de las NPs impidiendo en muchos casos que moléculas como los péptidos los cuales presentan baja sección eficaz SERS se puedan adsorber sobre la superficie metálica y se pueda obtener una buena relación señal/ruido SERS. Este efecto puede estar relacionado principalmente con el tipo de interface de las NPs en disolución que adquieren un elevado valor de carga negativa aportado principalmente por las moléculas de citrato que evitan el acercamiento de los péptidos por la repulsión electrostática [173, 184]. Por tal motivo se decidió utilizar NPs esféricas de Au para realizar las medidas SERS pues en la bibliografía se han encontrado métodos de obtención de nanoesferas de Au con cantidades de citrato

variable. El coloide de AuCT₅₀ utilizado en las medidas SERS de los péptidos se preparó siguiendo el método reportado por Frens [185] con una cantidad menor de CT para disminuir la carga superficial de las NPs y potenciar el acercamiento de la molécula a la superficie metálica.

Las condiciones óptimas de medidas para los péptidos analizados mediante la técnica SERS se obtuvieron teniendo en cuenta un estudio previo realizado en nuestro grupo de investigación sobre el péptido de SST-14. Donde se investigó la influencia del CT en la interfase de las NPs de Au. Este efecto se observó también en otro trabajo de nuestro grupo acerca de la estabilidad del puente disulfuro formado por el aminoácido Cys en presencia de NPs de Ag [186]. Antes de realizar los estudios de los péptidos LAN, SOM230 y β Am mediante SERS se realizaron una serie de medidas y experimentos para encontrar las mejores condiciones óptimas con la máxima relación señal/ruido en los espectros SERS. La longitud de onda de excitación utilizada en los coloides AgHxCu fue de 532 nm y para el coloide de AuCT₅₀ fue de 785 nm, utilizando como agente agregante externo una disolución acuosa de KNO₃ a 0.5 M en ambos casos.

Para llevar a cabo los experimentos SERS en modo “micro” del péptido β Am₁₋₄₀ se emplearon las nanoestrellas NSAg205. Estas NPs se consideraron idóneas para realizar este estudio ya que en su procedimiento de fabricación se emplea una menor cantidad de CT (ver tabla 4.1). 5 μ L de suspensión de este coloide fueron depositados previamente sobre la superficie de un porta-objetos de vidrio por evaporación del disolvente (H₂O) a temperatura ambiente se lavaron con H₂O varias veces para eliminar así el CT en exceso presente por el proceso de fabricación de las NPs. A continuación una alícuota de la disolución del péptido a concentración 0,22 μ M fue añadida sobre la película de NPs y se registraron espectros diferentes en puntos tomados al azar.

Los espectros obtenidos mediante SERS, Raman y espectrofotometría UV-visible fueron analizados y procesados con el programa OriginPro 7.5G SR6 (<http://www.originlab.com>) [187].

Las muestras observadas por microscopía electrónica TEM y SEM se prepararon depositando una alícuota (~5 μ L) del coloide previamente diluido al 10 % en H₂O MilliQ sobre una rejilla de cobre recubierta con una capa fina (30-50 nm) de carbono puro. Posteriormente se evaporó el H₂O exponiendo la muestra bajo una lámpara. No fue necesaria una metalización extra para las muestras medidas en SEM porque las NPs

son conductoras. Las imágenes TEM se analizaron con el programa de computación ImageJ 1.46r, versión libre (<http://imagej.nih.gov>) [188]. El número de NPs analizadas en el procesamiento estadístico fue de ~ 80 NPs para cada uno de los casos.

La preparación de las muestras para la microscopía de campo oscuro se realizó siguiendo el protocolo de preparación de muestras biológicas descrito por Verebes y colaboradores para las medidas con el instrumento CytoViva [189]. El procesamiento de los datos obtenidos mediante la técnica EDFM se realizó siguiendo las siguientes pautas. Los espectros dentro de cada pixel del área escaneada fueron medidos con un espectrofotómetro CytoViva con una cámara CCD integrada. Los datos espectrales obtenidos fueron analizados con el programa de computación de análisis hiperespectral ENVI 4.4 y el ITT *Visual Information Solutions* (<http://www.exelisvis.com>), obteniéndose así las imágenes hiperespectrales EDFM. El procesamiento de este tipo de imagen implicó una serie de pasos para la construcción de las librerías espectrales, tal como se describe a continuación.

Las librerías espectrales creadas agrupan una serie de espectros característicos denominados *endmembers* que van a ser utilizados a la hora de procesar las imágenes hiperespectrales EDFM obtenidas. Los espectros *endmembers* fueron obtenidos mediante la selección de un área de interés de la muestra escaneada. Esta selección permitió escoger un número representativo de píxeles correspondiente a la que mejor se ajustaba a la morfología de las nanopartículas. Cuando los espectros característicos se identificaron, se procedió a guardarlos en la librería espectral para utilizarlos en un paso posterior en el procesamiento de las imágenes hiperespectrales y así crear un mapa espectral para distintas muestras. Finalmente se creó un Mapa de Ángulo Espectral (SAM, por sus siglas en inglés, *Spectral Angle Mapper*) que permitió analizar la similitud entre los diferentes píxeles de las imágenes y los espectros *endmembers*. La creación de los SAMs implicó la implementación de un cálculo teniendo en cuenta el ángulo formado entre la imagen y el espectro *endmember*, haciendo un tratamiento de vectores en un espacio n-D, donde n representa el número de bandas del espectro. El mejor ajuste se obtuvo cuando el ángulo entre el *endmember* y la muestra espectral es el de menor valor posible. Las librerías se asignaron a las imágenes de interés por falso-coloreado del pixel y si se encontraban dentro del valor de 0.1 radianes para uno de los espectros de la librería.

4.3.4 Análisis por Componentes Principales

El método de análisis multivariante se ha utilizado en múltiples ocasiones para simplificar el tratamiento y la interpretación de numerosos datos. Entre ellos, el análisis de componentes (PCA) es ampliamente aplicado para simplificar la interpretación de resultados en sistemas complejos [190-192]. El análisis está basado en la representación de un espacio de dimensión “n” (donde n es el número de variables que existen en un sistema) reducido a un pequeño número de componentes principales (PC), siendo cada componente principal una combinación lineal de las variables iniciales que contribuyen mayormente a diferenciar unas muestras de otras. El análisis y procesamiento estadístico de los datos obtenidos se realizó con el programa de computación *The Unscrambler X 10.3* (<http://www.camo.com>) [193].

4.3.5 Isotermas de adsorción

La adsorción de una molécula sobre la superficie de las NPs plasmónicas se puede estudiar mediante la técnica SERS, usando las intensidades de los espectros para obtener verdaderas isotermas de adsorción. Ello es así por dos motivos: i) las únicas moléculas que dan señal SERS son aquellas directamente adsorbidas sobre la superficie, debido al efecto de corto alcance de la intensificación LSPR, y ii) la concentración de moléculas adsorbidas respecto a la concentración total existente en el medio es muy baja, por lo que, a concentraciones suficientemente altas, podemos aproximar la cantidad de moléculas no adsorbidas en equilibrio con la superficie con las moléculas totales existentes en el medio. Esta última aproximación es aún más cierta si se tiene en cuenta que el número de moléculas que da lugar a señal SERS es en realidad el reducido número de moléculas que se encuentran en los puntos de máxima intensificación SERS, es decir, los *hot spots* situados en determinados puntos sobre la superficie de las nanoestrellas.

Como ya se ha visto en la sección 2.6.1 en los casos donde la cinética de adsorción sigue un modelo tipo Langmuir, implica que las moléculas se adsorben sobre la superficie mediante la formación de una monocapa de adsorbato sobre la misma hasta que se alcanza su saturación. Este modelo implica a su vez que existe una interacción intermolecular despreciable. En este caso la ecuación que rige el recubrimiento de una superficie (θ) al aumentar la concentración de un adsorbato A en el medio es:

$$\theta = \phi / \phi_0 = \frac{K_{ad}[A]}{1 + K_{ad}[A]} \quad (4.1)$$

Donde K_{ad} es la constante de adsorción de Langmuir en la superficie, ϕ es el número de moléculas adsorbidas a la concentración $[A]$ y ϕ_0 es el número máximo de moléculas que pueden adsorberse dada la superficie total disponible. Debido a que la intensidad SERS depende exclusivamente del número de moléculas adsorbidas sobre la superficie plasmónica, es decir, $I_s = a \cdot \phi$ la fracción de recubrimiento puede relacionarse con la intensidad SERS mediante I_s/I_{sm} , donde I_s es la intensidad del espectro SERS del adsorbato incluido a una concentración $[A]$ e I_{sm} es la intensidad SERS en condiciones de saturación de la superficie, es decir, cuando la concentración de adsorbato es $[A]_m$. Asimismo, teniendo en cuenta la aproximación anterior, podemos considerar que la concentración del adsorbato en el equilibrio ($[A]$) es prácticamente igual a la concentración total de adsorbato en el medio ($[A] \cong C_T$). Por lo tanto, puede construirse una isoterma de adsorción empleando una ecuación tipo Langmuir para ajustar la intensidad SERS frente a la concentración del compuesto en la muestra analizada, tal que:

$$I_s = \frac{K_{ad} I_{sm} [A]}{1 + K_{ad} [A]} \quad (4.2)$$

Las isotermas de adsorción pueden entonces ser construidas mediante la representación de I_s frente a $[A]$. A partir de las isotermas de adsorción, la detección de la molécula puede entonces ser realizada por debajo de $[A]_m$, y por encima de la concentración mínima que constituye el límite de detección (LOD). Es conveniente encontrar entre estas concentraciones la denominada región de linealidad (RL), es decir, el intervalo de concentraciones en el que la relación entre la intensidad SERS y la concentración sigue una relación lineal. Esta zona de lineal constituirá la recta de calibrado para llevar a cabo la detección del compuesto.

En la construcción de isotermas de adsorción a partir de los espectros SERS se ha empleado la siguiente metodología: a) obtención de espectros SERS en condiciones óptimas (empleando el sustrato SERS, el pH y la longitud de onda de excitación que da lugar a máximas intensidades SERS); b) selección de bandas marcadoras que se relacionen con la cantidad de analito en la muestra (generalmente se eligió una banda

intensa que esté poco afectada por posible efectos de reorientación que pudiera sufrir la molécula al variar su concentración); c) selección de una banda de referencia para la obtención de las intensidades relativas de las bandas marcadoras.

Estas isothermas se obtuvieron a partir de las intensidades de los espectros SERS obtenidas a diferentes concentraciones. Los resultados relacionados con este tema se verán más adelante en el capítulo 5 en el que se estudian los colorantes histológicos ThT y CR y los péptidos LAN y SOM230 en presencia de NPs metálicas de diferentes propiedades físico-químicas.

4.3.5.1 Límite de detección

Una vez estudiada la adsorción de los analitos sobre las nanopartículas metálicas empleadas en el estudio SERS, siguiente paso consistente en la cuantificación mediante el cálculo del límite de detección para la técnica SERS. Para ello se procedió a la realización de las curvas de calibrado, donde es necesario encontrar la región de linealidad (RL) para la relación $I_s/[A]$, comprendida entre el límite de detección (LOD) y el límite de linealidad (LL). Esta región está situada normalmente dentro de una zona de concentraciones relativamente bajas, entre ppt y ppm (pg/mL y µg/mL, respectivamente), valor éste que depende de cada analito [32, 194]. A partir de los valores $I_s/[A]$ se puede determinar el límite de detección, es decir la cantidad más pequeña de analito que puede ser detectada de manera fiable en unas condiciones determinadas [194-196]. El límite de linealidad está relacionado con el valor de la superficie total de adsorción disponible (STA) en los sistemas de nanopartículas empleados. Normalmente la RL se encuentra poco afectada por la agregación de las NPs, ya que la región entre ppt y ppm es suficientemente baja para que no ocurra una agregación significativa debida a la adsorción del compuesto. En estas condiciones es donde se tiene que el valor de I_s se corresponde de manera proporcional con la cantidad de moléculas adsorbidas sobre la superficie.

En el caso de analitos como el CR adsorbido sobre las NPs plasmónicas siguiendo un modelo de adsorción tipo Langmuir, se tiene la región de linealidad cuando la concentración es muy baja. Para estas condiciones se tiene que $K_{ad}[A] \ll 1$, por lo que la función de Langmuir aplicable a los datos SERS la ecuación 5.2 puede simplificarse en la siguiente expresión:

$$I_S = K_{ad} \cdot I_{sm}[A] \quad (4.3)$$

La pendiente de la recta representa la sensibilidad de la técnica SERS para una determinada sustancia, que depende directamente de la afinidad de la molécula por la superficie (K_{ad}) y de la superficie total de adsorción disponible (que influye en el valor de I_{sm}). El límite de detección puede ser deducido a partir de los espectros SERS y puede expresarse mediante la ecuación:

$$I_{LOD} = I_0 + 3\sigma_0 \quad (4.4)$$

Donde I_{LOD} es la intensidad de la señal en el límite de detección, I_0 es la intensidad del blanco (coloide en las condiciones de medida y en ausencia del analito) y σ_0 es la desviación estándar del blanco [196, 197].

La concentración límite detectable (LOD) en cada uno de los casos estudiados en esta Tesis se calculó sustituyendo el valor de I_{LOD} obtenido mediante la ecuación 4.4 en la recta de calibrado (4.3) para cada sistema.

5. Resultados y Discusión

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS FABRICADAS EN ESTE TRABAJO

Las NPs fabricadas en esta tesis fueron caracterizadas mediante diferentes técnicas para comprobar sus propiedades físico-químicas y a su vez su eficacia como posibles sustratos SERS. La morfología de estos sistemas se inspeccionó a través de las microscopías electrónicas de transmisión (TEM) y barrido (SEM). También se analizó la resonancia de plasmón de las nanopartículas en suspensión mediante la espectrofotometría UV-visible. Asimismo, la microscopía de campo oscuro (DFM) se empleó para el análisis de NPs individuales inmovilizadas sobre soportes. Esta última técnica ha proporcionado una información adicional de gran valor, ya que a pesar de la complejidad de las NPs en cuestión, ha permitido registrar los espectros de extinción de las nanoestrellas individuales.

Finalmente, se ha utilizado la espectroscopía SERS para determinar la composición química de la corteza de las nanoestrellas huecas utilizando una molécula de prueba, en este caso la lucigenina, que presenta diferentes mecanismos de adsorción sobre la superficie metálica de las nanopartículas en dependencia del metal con que interactúe.

5.1.1 Caracterización de coloides metálicos de nanopartículas esféricas

Las nanopartículas con forma de estrella fabricadas en esta Tesis se compararon con las NPs esféricas obtenidas mediante los métodos empleados hasta la fecha, con el fin de evaluar la mejora como sustratos SERS de las nanoestrellas. Las NPs esféricas se obtuvieron y caracterizaron, y sus propiedades plasmónicas, así como su eficacia como sustratos SERS, fueron comparados con los nuevos sistemas obtenidos en este trabajo.

Los métodos empleados para fabricar dichas NPs esféricas fueron los siguientes:

- 1) Reducción química con citrato trisódico (CT) de las respectivas sales (AgNO_3 y $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) en disolución, empleando los métodos descritos por Lee-Meisel y Frens [198].
- 2) Reducción química mediante clorhidrato de hidroxilamina (HxCl) empleando el método propuesto por Leopold y Lendl [199].

Estos métodos permiten la preparación de nanopartículas de Ag y de Au con formas aproximadamente esféricas. Las propiedades ópticas de estas NPs esféricas varían en función del tamaño y el medio que rodea a las NPs. Tal y como muestra la fig. 5.1-B, a través de las micrografías TEM, el tamaño de las NPs de oro obtenidas por reducción química con CT tienen como promedio 16 nm de diámetro, mientras que las NPs de plata obtenidas por ambos métodos (reducción química con CT o HxCl) presentan 50 nm de diámetro medio.

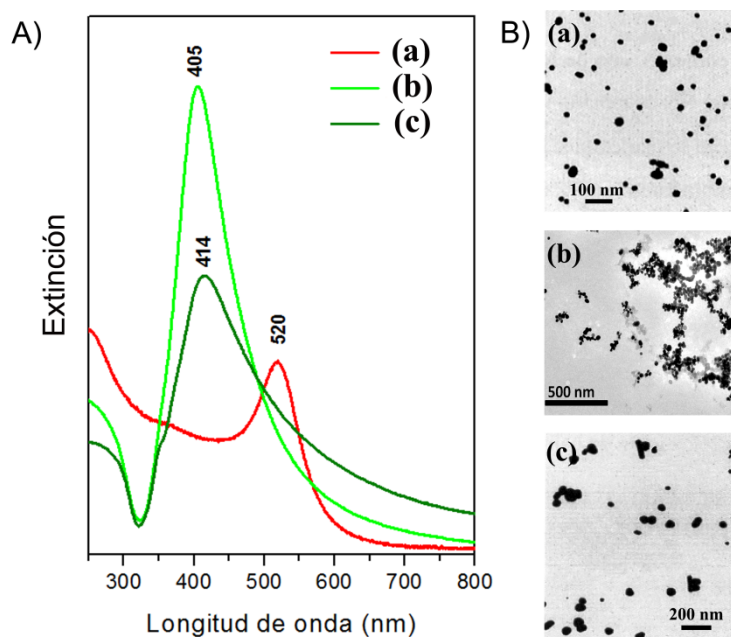


Figura 5.1: A) Espectros de extinción de coloides de NPs esféricas: AuCT (a), AgHxCl (b) y AgCT (c). B) Imágenes TEM de los coloides AuCT (a), AgHxCl (b) y AgCT (c).

La fig. 5.1A muestra los espectros de extinción para cada una de las suspensiones coloidales que contienen NPs esféricas. Teniendo en cuenta que las NPs son mayoritariamente esféricas, en los espectros se puede observar un máximo de extinción correspondiente al LSP. Según describe la Teoría de Mie [200], para NPs esféricas el máximo de extinción queda descrito por un único máximo de resonancia correspondiente a la oscilación dipolar de electrones en las NPs. La posición de dicho máximo es función del tamaño de las NPs, mientras más pequeñas son, la resonancia está desplazada hacia el azul, para un metal dado. Por otro lado, la anchura a mitad de la altura proporciona una medida relativa de la dispersión de tamaños, que para el caso del coloide de oro es menor que para los coloides de plata. La posición relativa del máximo de extinción varía en función de diferentes factores: i-) del tamaño de las

NPs, a medida que aumenta el diámetro de las NPs ocurre un desplazamiento hacia el rojo del plasmón, además ii-) de las propiedades dieléctricas del medio que las rodea y del metal con el que se fabriquen las NPs, debido a las componentes real e imaginaria de la constante dieléctrica del metal que varía de un elemento a otro [11].

5.1.2 Caracterización de coloides metálicos de nanopartículas con forma de estrella

A. Nanoestrellas de plata

Los espectros de extinción de las nanopartículas obtenidas a las distintas condiciones experimentales mencionadas en la tabla 4.1 de la sección 4.3.1, se muestran en la fig. 5.2. Los espectros de extinción de los coloidales de (NSAg) indican una distribución muy variada y compleja de NPs en suspensión. Aunque es de destacar la presencia de un máximo de extinción a 384 nm, que en muchos casos está seguido de un hombro que aparece a 425 nm, los cuales se asocian al LSPR del volumen (*bulk*).

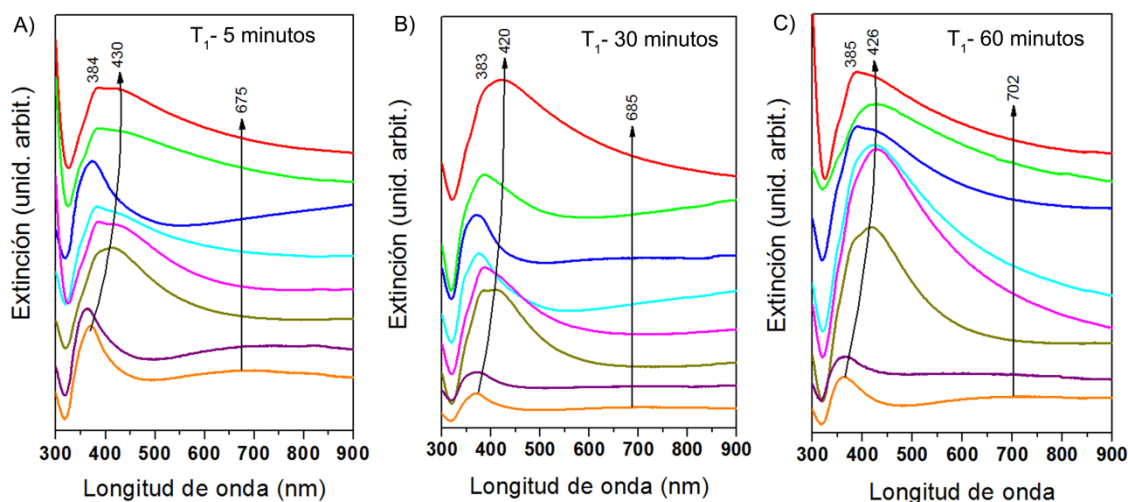


Figura 5.2: Espectros de extinción de las nanopartículas NSAg bajo diferentes condiciones de reacción: NSAg1 (rojo); NSAg2 (verde); NSAg3 (azul); NSAg4 (celeste); NSAg5 (rosa); NSAg6 (morado); NSAg7 (mostaza) y NSAg8 (naranja) preparadas empleado diferentes tiempos (T_1) entre la primera reducción con Hx y la segunda con CT: A) 5 minutos; B) 30 minutos y C) 60 minutos. Todos los espectros de extinción fueron tomados a las 24h de fabricados los coloides. Todos los espectros están normalizados al máximo de extinción presente para cada espectro.

En el caso de las NPs obtenidas siguiendo las condiciones siete y ocho de la tabla 4.1 para los tres tiempos T_1 estudiados (5, 30 y 60 minutos), se puede distinguir un

segundo máximo de extinción de mucha menor intensidad a mayores longitudes de onda: 675, 685 y 702 nm en A, B y C de la fig. 5.2, respectivamente. Este amplio fondo en el espectro de extinción puede asociarse a la absorción y emisión de la dispersión producida por las diferencias de tamaños y formas que presentan las NSAg. Estas diferencias están determinadas por la variabilidad que presentan las nanopartículas en el número de puntas y tipos de formas diferentes de estrellas encontradas. La unión de todos estos factores hace que el espectro LSPR de las NSAg sea muy variado y complejo, abarcando un amplio rango de longitudes de onda en la región visible e infrarrojo cercano del espectro [201].

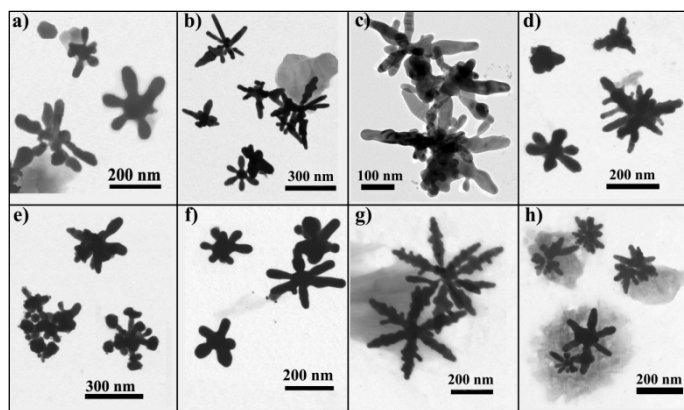


Figura 5.3: Imágenes TEM de las diferentes muestras de nanopartículas a $T_1=5$ minutos: a) NSAg105; b) NSAg205; c) NSAg305; d) NSAg405; e) NSAg505; f) NSAg605; g) NSAg705 y h) NSAg805.

Mediante las imágenes obtenidas por microscopía electrónica se pudo observar la forma, tamaño y distribución de las nanoestrellas de plata obtenidas bajo las condiciones descritas en la sección 4.3.1. En las fig. 5.3, 5.4 y 5.5 se pueden ver las imágenes TEM obtenidas para los tres tiempos T_1 estudiados (5, 30 y 60 minutos respectivamente).

Las variables morfológicas que se estudiaron para la caracterización de las NSAg fueron: a (longitud del brazo), b (anchura de la punta) y d (diámetro total de la NP determinado por la distancia de una punta a la punta opuesta), tal como se muestra en la fig. 5.6A. La tabla 5.1 muestra las variables morfológicas medidas para cada uno de los coloides fabricados bajo las diferentes condiciones experimentales descritas en la tabla 4.1 a partir de las imágenes TEM obtenidas de cada muestra.

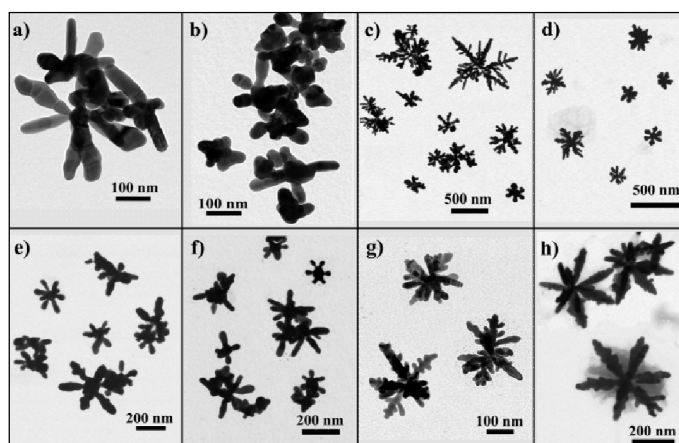


Figura 5.4: Imágenes TEM de las diferentes muestras de nanopartículas a $T_1=30$ minutos: a) NSAg130; b) NSAg230; c) NSAg330; d) NSAg430; e) NSAg530; f) NSAg630; g) NSAg730 y h) NSAg830.

Un análisis más exhaustivo de las NS fabricadas se realizó mediante el método de PCA (Análisis de Componentes Principales) que se detallará más adelante. Las variables morfológicas mencionadas en el párrafo anterior se utilizaron para clasificar y asociar a las NSAg en diferentes grupos. El análisis estadístico se realizó sobre un número de NPs de 50 en cada muestra, calculándose así la media y la desviación estándar para cada una de la variables morfológicas (*a*, *b* y *d*) analizadas, ver fig. 5.6.

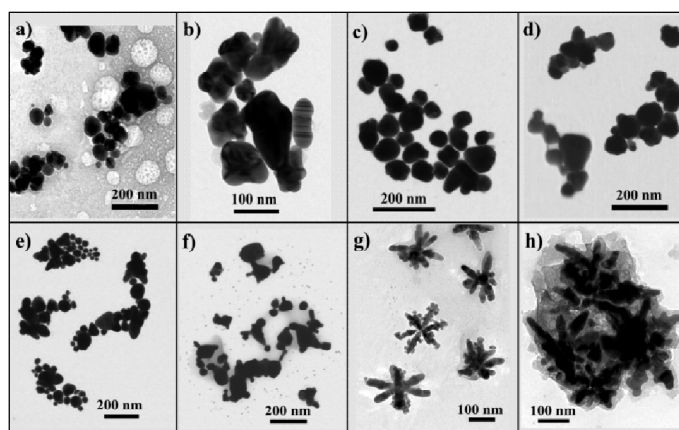


Figura 5.5: Imágenes TEM de las diferentes muestras de nanopartículas a $T_1=60$ minutos: a) NSAg160; b) NSAg260; c) NSAg360; d) NSAg460; e) NSAg560; f) NSAg660; g) NSAg760 y h) NSAg860.

A partir de las imágenes TEM obtenidas para cada una de las diferentes muestras de NS, se propuso un posible mecanismo de formación y crecimiento de las nanoestrellas (ver fig. 5.6B).

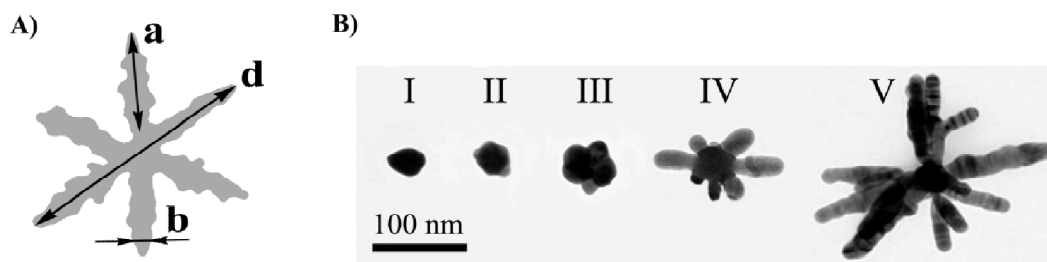


Figura 5.6: A) Esquema de una nanoestrella señalizando las variables evaluadas para la caracterización morfológica: *a*-longitud del brazo, *d*-diámetro de la NP y *b*-anchura de la punta. B) Esquema del mecanismo de formación y crecimiento de las nanopartículas NSAg propuesto en esta tesis, deducido a partir de las imágenes TEM obtenidas a partir del proceso de formación. Las NPs I-III muestran un aspecto facetado resultante de la acción reductora de Hx. Las NPs IV y V fueron registradas a las 24h y 48h de reducción con citrato, respectivamente.

Según se pudo comprobar el tiempo transcurrido entre ambas reducciones (T_1) es un factor muy importante que determina en gran medida las características morfológicas de las NS. Para los casos en que $T_1 = 60$ min. (ver micrografías TEM de la fig. 5.5), se puede ver que muchas de las NPs muestran una morfología altamente facetada y no presentan una forma de estrella, sino que son NPs con algunas ramificaciones de corta longitud, como muestran las imágenes I-III de la fig. 5.6-B. Este comportamiento está asociado con el hecho de que la primera reducción con hidroxilamina neutra, induce el crecimiento de NPs facetadas (cubos truncados, cuboctaedros, octaedros), por tratarse de un reductor con un relativo bajo poder de reducción, lo que permite la formación de nanopartículas con estructura más cristalina y un crecimiento selectivo de las caras (1,0,0) en relación con las caras (1,1,1) [202, 203]. Esto da como resultado, paradójicamente, a la formación de cristales con formas en donde predominan las caras (1,1,1). La reducción con Hx neutra también propicia en algunas ocasiones la formación de nanoestrellas pero a una velocidad muy lenta y en menor medida. Aunque no se ha determinado de manera precisa bajo qué condiciones se producen estas nanoestrellas en un solo paso, es posible que esto ocurra cuando el tiempo de reducción con hidroxilamina se dilata en el tiempo. Mientras que, si se añade el CT en un segundo paso, se acelera el crecimiento de las NS a partir de las caras (1,0,0) de las NPs facetadas, lo que da lugar al crecimiento de brazos o ramificaciones con diferentes formas: prolongaciones simples o con forma de *hearing bone* o *dog bone*, llegando así a la configuración final de nanopartículas ramificadas en función de las variables de la fabricación [204].

Otra función que realiza el CT en el medio, aparte de ayudar al crecimiento de las NS, es la de brindarle estabilidad a las NPs para evitar su precipitación. A modo de conclusión preliminar se puede inferir que el método de reducción química es una forma nueva, fácil y rápida de obtener nanoestrellas metálicas de plata con una heterogénea distribución de tamaños y formas. Se demuestra mediante este estudio que a través de la modificación de las condiciones experimentales se pueden inducir diferentes variables morfológicas, lo que permite controlar la morfología final de las nanopartículas. Esta característica hace que el método ideado en esta Tesis sea una prometedora propuesta en la fabricación de nanopartículas con diferentes formas y tamaños. Asimismo, este método da lugar a la formación de nanopartículas con notables aplicaciones en SERS debido a la ausencia de agentes surfactantes sobre la superficie. Por otra parte, este método es compatible con las prácticas recomendadas en la química verde, pues en la fabricación de las NS descritas aquí se usan reactivos con bajo impacto medioambiental y pocas interferencias en los espectros Raman resultantes.

Tabla 5.1: Valores promedios de las variables morfológicas empleadas para la caracterización de las nanoestrellas: *d*- diámetro de punta a punta opuesta de la NP, *a*-largo del brazo, *b*-ancho de la punta y σ -desviación estándar para $n = 50$.

NSAg	105	130	160	205	230	260	305	330
<i>d</i> $\pm\sigma$	171 \pm 68	369 \pm 93	55 \pm 14	307 \pm 77	164 \pm 25	86 \pm 25	417 \pm 134	415 \pm 195
<i>a</i> $\pm\sigma$	59 \pm 22	184 \pm 45	-	129 \pm 50	87 \pm 21	-	187 \pm 75	254 \pm 89
<i>b</i> $\pm\sigma$	32 \pm 7	45 \pm 11	-	34 \pm 8	31 \pm 7	-	34 \pm 7	53 \pm 15
NSAg	360	405	430	460	505	530	560	605
<i>d</i> $\pm\sigma$	94 \pm 15	296 \pm 84	275 \pm 38	59 \pm 17	203 \pm 60	327 \pm 102	77 \pm 25	267 \pm 85
<i>a</i> $\pm\sigma$	-	103 \pm 36	138 \pm 16	-	77 \pm 28	142 \pm 49	-	74 \pm 34
<i>b</i> $\pm\sigma$	-	41 \pm 9	50 \pm 9	-	26 \pm 6	37 \pm 8	-	35 \pm 6
NSAg	630	660	705	730	760	805	830	860
<i>d</i> $\pm\sigma$	188 \pm 51	122 \pm 38	519 \pm 64	219 \pm 47	233 \pm 28	229 \pm 65	368 \pm 71	188 \pm 31
<i>a</i> $\pm\sigma$	83 \pm 34	-	270 \pm 43	111 \pm 27	109 \pm 10	107 \pm 27	218 \pm 27	94 \pm 26
<i>b</i> $\pm\sigma$	27 \pm 4	-	58 \pm 13	27 \pm 5	33 \pm 5	27 \pm 7	52 \pm 12	29 \pm 5

En la fig. 5.7 se muestran las imágenes de microscopía de campo oscuro (DFM) (A) junto con los espectros de dispersión (*scattering*) registrados para diferentes nanopartículas (B) y las correspondientes imágenes TEM (E). La columna C de la fig.

5.7 muestra el mapa construido a partir de los espectros de difusión individuales señalados en la columna B, tomando como referencia la imagen DFM obtenida por microscopía de campo oscuro (columna A). Finalmente, la columna D muestra la distribución en porcentajes por colores que corresponden a los espectros de difusión obtenidas a partir de la imagen de la columna A.

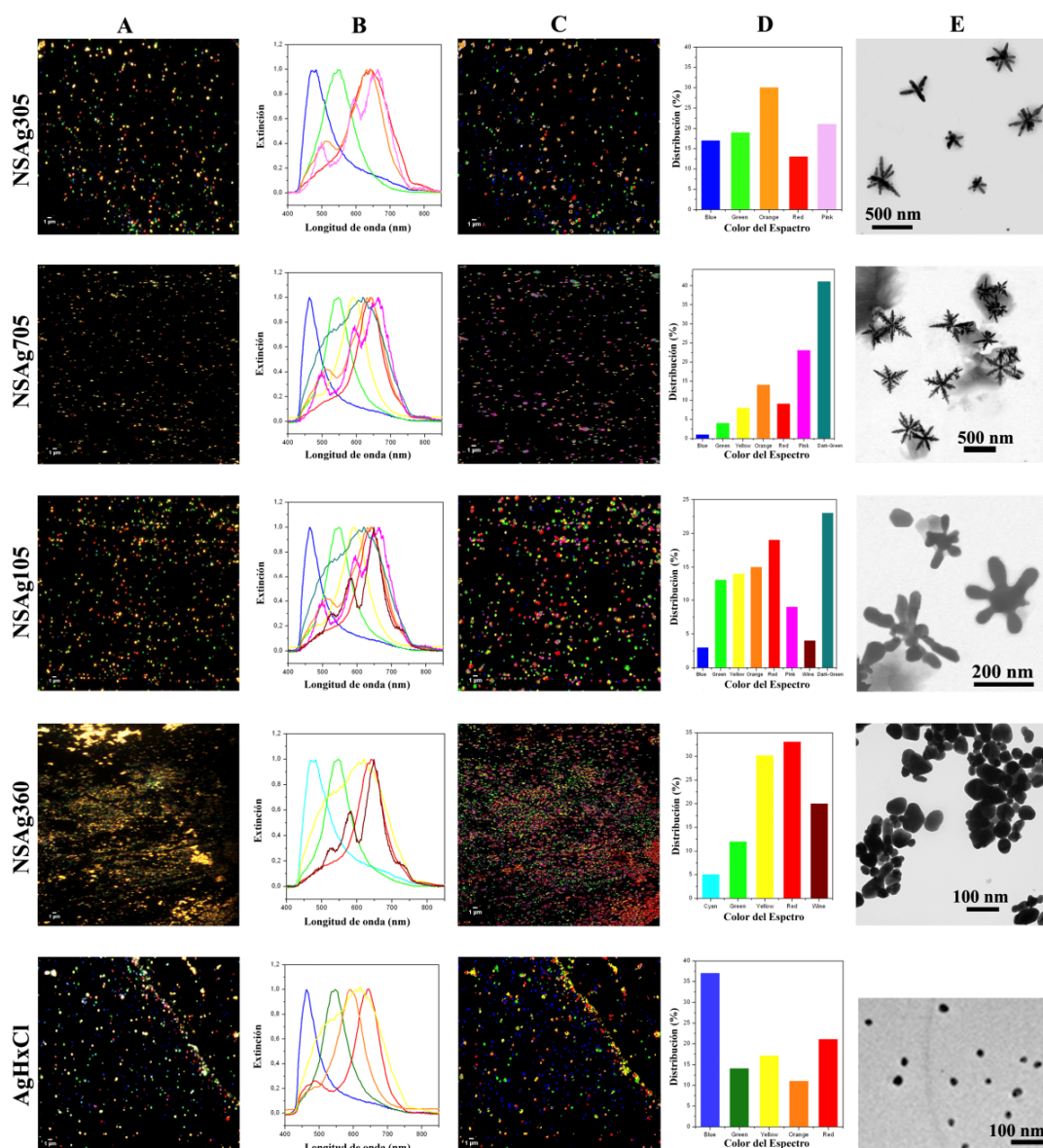


Figura 5.7: Imágenes obtenidas mediante microscopía de campo oscuro (35μm x 35μm) de las muestras NSAg105; NSAg705; NSAg305; NSAg360 y AgHxCl (A). Espectros de dispersión más frecuentes en las muestras medidas a partir de las imágenes obtenidas por DFM (B). Mapa de las imágenes obtenidas por DF utilizando los espectros de emisión más frecuentes del área analizada (C). Distribución de las NP metálicas analizando la distribución de color obtenida por los espectros de emisión más frecuentes (D). Imágenes TEM (E) de las muestras NSAg305; NSAg705; NSAg105; NSAg360 y AgHxCl.

Para la muestra NSAg305 en la fig. 5.7, la columna B muestra los espectros con máximos de emisión a 475 (azul), 550 (verde), 640 (naranja, con un hombro a 510 nm), 650 (rojo), y 670 nm (rosa, con dos hombros a 497 y 595 nm). El espectro de dispersión azul se puede asignar a la emisión que producen las NPs esféricas, mientras que los espectros observados a mayores longitudes de onda pueden atribuirse a las NS o a partículas agregadas. Los máximos observados en los espectros de extinción a diferentes valores de longitudes de onda pueden asociarse a la existencia de NS diferentes números de brazos [59].

Por otra parte, la columna B para la muestra AgHxCl (ver fig. 5.7), muestra los espectros de difusión de NPs individuales con máximos a 460 (azul), 545 (verde), 597 (naranja), 620 (amarillo, con un hombro a 550 nm) y 650 nm (rojo, con una contribución a 510 nm). El espectro azul puede ser igualmente asignado a la contribución que ofrecen las NPs esféricas, mientras que los espectros observados a mayores longitudes de onda pueden estar asociados a la contribución dada por la formación de agregados (dímeros, trímeros y agregados superiores), como muestra la imagen TEM de la columna E para la muestra AgHxCl en la fig. 5.7. Estos agregados se formarían como consecuencia del proceso de secado de la muestra. Particularmente para esta última muestra, se observa que la contribución de la dispersión del color azul aumenta con respecto al resto de colores (imagen AgHxCl-columna D). Este comportamiento puede estar relacionado con el hecho de que en esta muestra hay una mayor cantidad de NPs esféricas y agregados de menor tamaño, por lo que el aporte a la dispersión azul es superior que en el resto de muestras. Sin embargo, en el resto de muestras donde la presencia de NPs con forma de estrellas es mucho mayor (ver imágenes TEM de la columna E), la distribución de espectros de extinción está desplazada hacia el rojo 600-700 nm, principalmente.

La técnica de EDX permitió detectar la presencia de átomos de Ag en las nanoestrellas de Ag. El pico que aparece a 3.1 keV se corresponde con la línea Ag-L, que en este caso es la línea más intensa en la plata [95, 205]. Las líneas de C, O, Cu y Zn que se observan en el espectro de la fig. 5.8a pertenecen al soporte (rejilla de microscopía electrónica para TEM) en el que se depositaron las nanoestrellas.

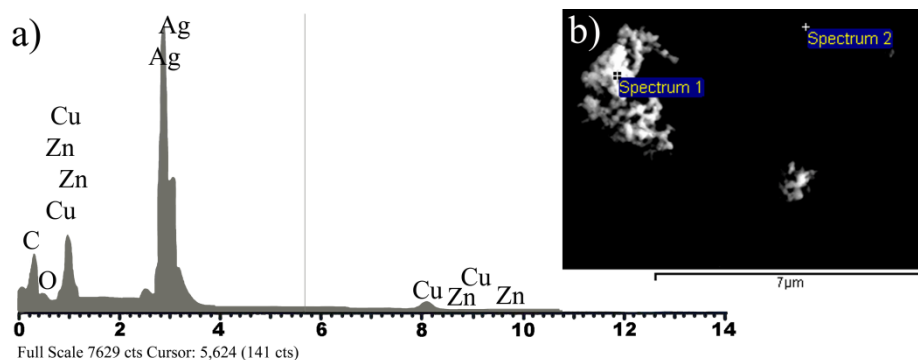


Figura 5.8: Espectro EDX (*Spectrum 1*) de la muestra NSAg305 (a) e imagen de la zona de la muestra donde se efectuó la medida EDX (b).

Para que el espectro EDX medido tuviese una buena relación señal/ruido se escogió un sitio de medida donde la cantidad de muestra fuera suficiente y esto se logra para una zona de agregados como se muestra en la fig. 5.8b.

B. Nanoestrellas huecas bimetálicas Au/Ag

Los espectros de extinción obtenidos a partir de las suspensiones coloidales de NPs huecas bimetálicas (NSAgAu) se pueden ver en la fig. 5.9 (panel de la izquierda), mientras que las correspondientes imágenes obtenidas por microscopía electrónica (TEM) se muestran a la derecha de la fig. 5.9.

Los espectros de extinción de las NSAgAu presentan una resonancia de plasmón dependiendo de la relación $\text{Ag}^+/\text{Au}^{3+}$ que se haya utilizado en la preparación de los coloides. La fig. 5.9 (e-h), muestra un máximo de extinción a 710 nm de longitud de onda (fig. 5.9a) para una relación molar $\text{Ag}^+/\text{Au}^{3+}$ igual a 1:1, mientras que cuando la relación $\text{Ag}^+/\text{Au}^{3+}$ es mayor (5:1), ver fig. 5.9c, el plasmón se desplaza a menores longitudes de onda (590 nm). Este desplazamiento se puede asociar al aumento en la concentración de plata en la superficie de la NP, ya sobre la superficie de las NPs se encuentran los dos metales presentes, formando una aleación, tal como muestran los dos últimos pasos de la fig. 4.2, de la sección 4.3.2.

El espectro (d) de la fig. 5.9 corresponde a NPs control preparadas sin utilizar las semillas de NSAg empleados para las NPs anteriores (ver tabla 4.2). En este caso la resonancia del plasmón aparece a una longitud de onda de 540 nm, cercana a la observada para NPs esféricas de oro (fig. 5.1a). El desplazamiento observado hacia

mayores longitudes de onda (desde 520 hasta 540 nm) del coloide AuNP (fig. 5.9d) puede estar relacionado con el distinto tamaño de las nanopartículas (~ 30 nm) y la forma (más facetadas), comparadas con las NPs obtenidas en el coloide AuCT, (ver fig. 5.1a).

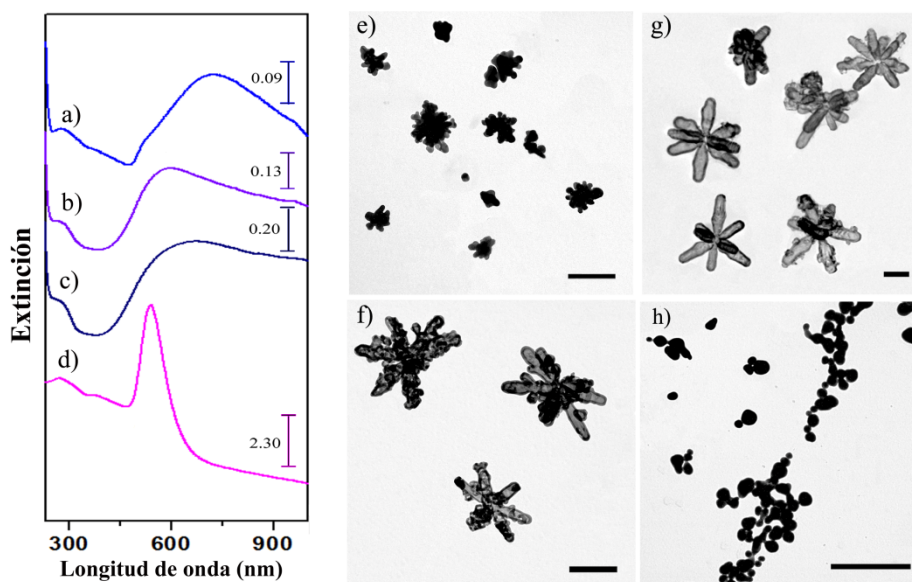


Figura 5.9: Espectros de extinción de coloides de nanoestrellas huecas: NSAgAu1 (a); NSAgAu2 (b); NSAgAu3 (c) y AuNP (d). Micrografías TEM de NSAgAu1 (e); NSAgAu2 (f); NSAgAu3 (g) y AuNP (h). La barra de escala corresponde a 100 nm.

Las imágenes TEM correspondientes a los coloides NSAgAu1, NSAgAu2 y NSAgAu3 (fig. 5.9 (e-h)) muestran NPs en forma de estrella mayoritariamente con una polidispersión de formas, donde las más frecuentes son estrellas de ocho puntas, presentando seis en el plano y dos perpendiculares a éste.

Tabla 5.2: Valores promedios de las variables morfológicas para las nanoestrellas huecas bimetalicas: d - diámetro de punta a punta opuesta de la NP, a -largo del brazo, b -ancho de la punta; c -grosor de la corteza de la NP y σ -desviación estándar para $n = 30$.

NSH	NSAgAu1	NSAgAu2	NSAgAu3	AuNP
$d \pm \sigma$	37 ± 12	122 ± 13	295 ± 14	24 ± 7
$a \pm \sigma$	14 ± 3	52 ± 8	145 ± 14	-
$b \pm \sigma$	7 ± 2	14 ± 3	41 ± 4	-
$c \pm \sigma$	-	3 ± 0.7	9 ± 2	-

La tabla 5.2 muestra los valores de las variables morfológicas para las nanopartículas huecas bimetálicas. En el caso de la muestra NSAuAg1 (fig. 5.9e) las NPs son más pequeñas que las NPs mostradas en las imágenes (g) y (f) de la fig. 5.9. Asimismo la longitud de las puntas (parámetro a) varía de una muestra a otra, aumentando a medida que se incrementa la relación $\text{Ag}^+/\text{Au}^{3+}$. Por otra parte, el grosor de la corteza de las NS huecas (parámetro c) en las muestras NSAgAu2 y NSAgAu3 se puede determinar claramente observando las imágenes TEM, mientras que para el caso de la muestra NSAgAu1, el espesor no se puede distinguir fácilmente. Este efecto se atribuye a que la cantidad de plata utilizada para obtener las semillas de partida en el primer paso de síntesis es diez veces menor en NSAgAu1 que la utilizada para la muestra NSAgAu3. Por lo tanto en este tipo de muestra se forma la NP facetada inicial sobre la que posteriormente crecen los brazos de las NPs de Au. Es por ello que en las imágenes TEM correspondientes a la muestra NSAgAu1 (fig. 5.9e) aparecen NPs con un núcleo denso y oscuro sin mostrar la formación de una oquedad en su interior. Sin embargo, las NPs de NSAgAu2 y NSAgAu3 se observa la existencia de NPs huecas donde es posible distinguir un claro cambio de densidad y contraste en las imágenes de microscopía electrónica que indican la formación de una corteza metálica.

Para obtener mayor información sobre la resonancia del plasmón en NPs individuales de las nanoestrellas huecas bimetálicas se realizaron medidas de microscopía de campo oscuro en varias muestras, siguiendo en esencia las mismas pautas desarrolladas en el estudio de las NSAg en la sección anterior.

En la fig. 5.10 se pueden apreciar las imágenes obtenidas por DFM (columna A) para tres muestras diferentes: NSAgAu1, NSAgAu3 y AuNP. Los mapas obtenidos a partir de los espectros individuales de difusión (columna B) aparecen en la columna D de la figura, mientras que en la columna E se muestran los porcentajes de distribución de colores del área mostrada en el mapa de la columna C. También se muestran imágenes TEM en la columna E asociada a cada una de las muestras analizadas.

Para el caso de la muestra NSAgAu1 los espectros de difusión o *scattering* encontrados con mayor frecuencia son los que presentan un máximo a 595 (rosa), 620 (amarillo con un hombro a 530 nm), 635 (naranja) y 641 nm (rojo). Los diferentes espectros de difusión que describen a las NPs individuales de la muestra NSAgAu1

pueden indicar la presencia de muestras con tamaños y formas variadas como se puede observar en la micrografía TEM (columna E para la muestra NSAgAu1).

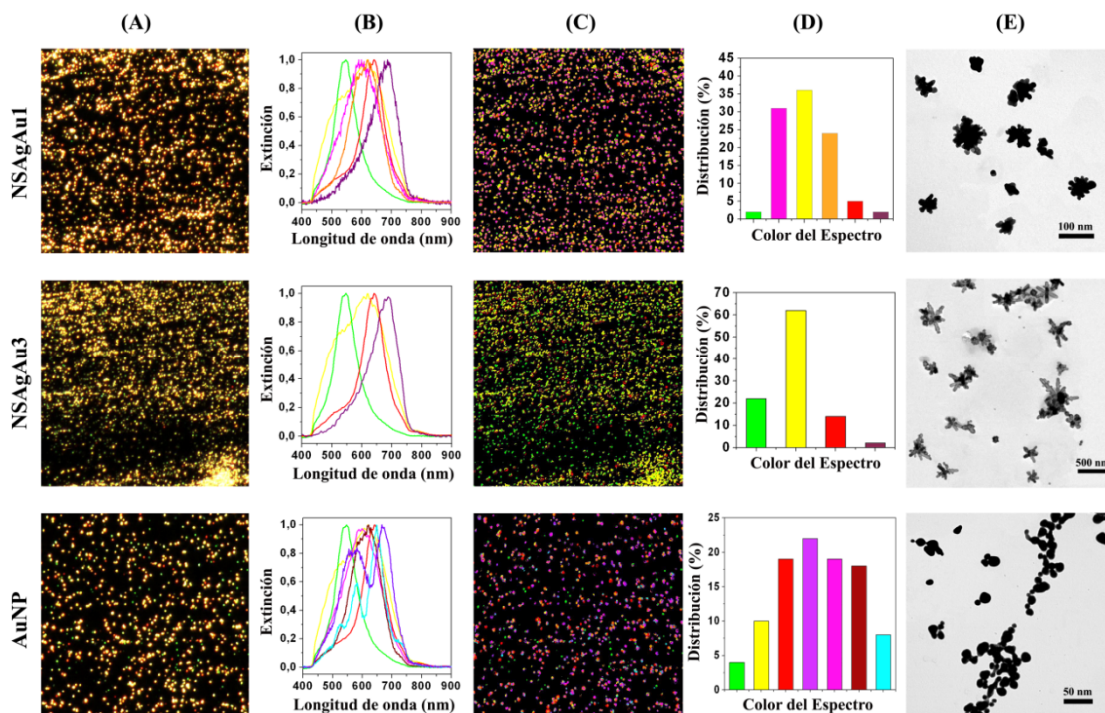


Figura 5.10: Imágenes obtenidas mediante microscopía de campo oscuro ($35\mu\text{m} \times 35\mu\text{m}$) de las muestras NSAgAu1, NSAgAu3 y AuNP (A). Espectros de difusión o scattering más frecuentes en las muestras medidas a partir de las imágenes obtenidas por DF (B). Mapa de las imágenes obtenidas por DF utilizando los espectros de difusión más frecuentes del área analizada (C). Distribución de las NP metálicas analizando la distribución de color obtenida por los espectros de difusión más frecuentes (D). Imágenes TEM (E) de las muestras NSAgAu1, NSAgAu3 y AuNP.

Por otra parte, la muestra NSAgAu3 muestra máximos principalmente a 545 (verde), 620 (amarillo, con un hombro a 530nm), 641 (rojo) y 690 nm (morado) en la fig. 5.10. El espectro de extinción correspondiente a NPs individuales con un máximo a 620 nm y una contribución del 60%, puede ser atribuido mayoritariamente a la morfología de NS representada en la imagen TEM de la muestra NSAgAu3 (fig. 5.9g).

5.1.3 Clasificación de las nanoestrellas de plata teniendo en cuenta su morfología mediante el estudio por PCA

Este método se ha aplicado en el análisis de muestras de elevada complejidad morfológica. Las nanoestrellas de Ag fabricadas mediante diferentes condiciones experimentales generó una gran cantidad de NPs diferentes entre sí y el método PCA

facilitó la interpretación y clasificación de las muestras obtenidas en diferentes grupos. En la sección 5.1.2 se obtuvieron una serie de datos relacionados con las variables morfológicas derivadas del análisis de las imágenes obtenidas por microscopía electrónica de transmisión de los diferentes coloides de nanoestrellas de plata. El número de datos generados se clasificó por análisis multivariante (PCA) para facilitar la interpretación de los resultados.

Los gráficos tipo Bi-plot permiten una representación en forma de dispersión en dos dimensiones para dos componentes principales (PC), donde se encuentran conjuntamente tanto los *Scores* como los *Loadings* en el mismo gráfico. Este tipo de función se encuentra al realizar un estudio por PCA y permite interpretar propiedades de la muestra y relaciones variables simultáneamente.

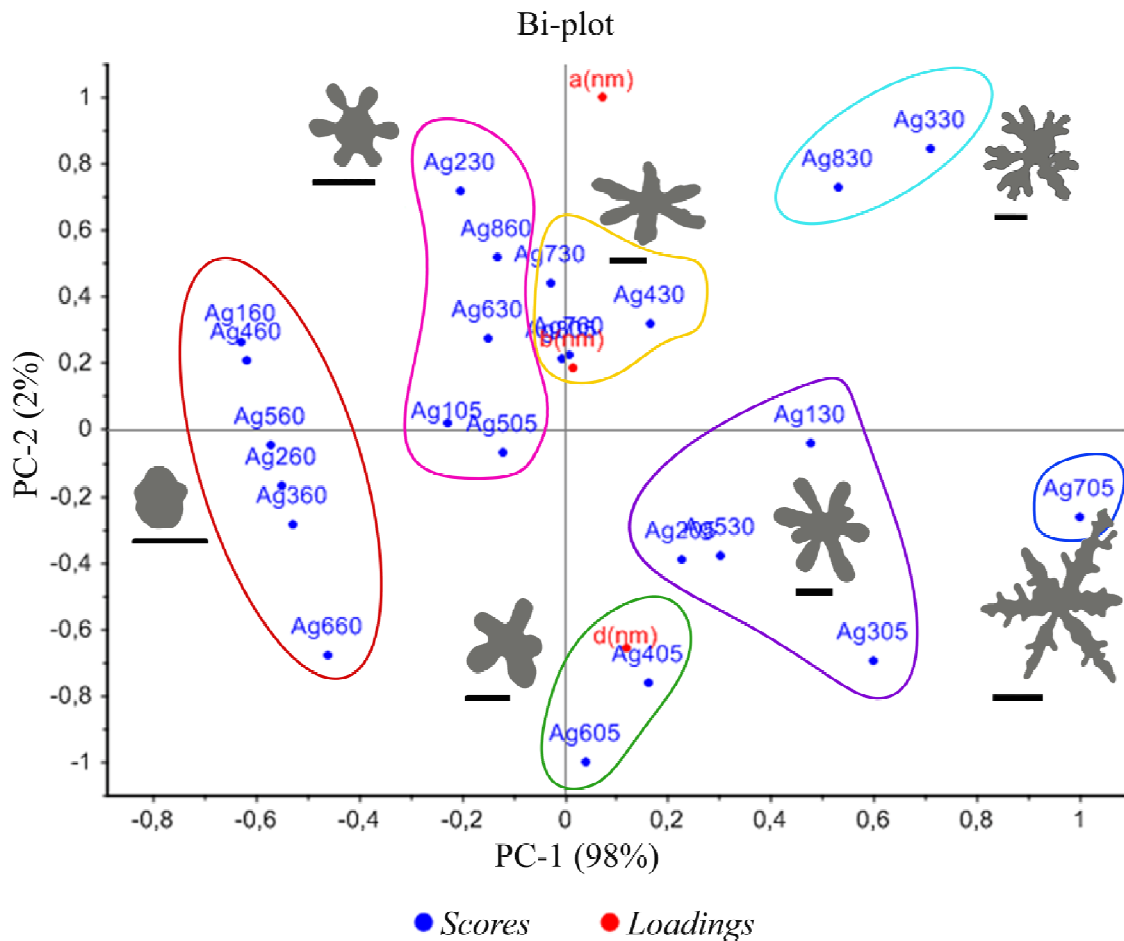


Figura 5.11: Gráfico Bi-plot de los *Scores* y *Loadings* de los dos primeros componentes principales mediante PCA de las nanoestrellas de plata fabricadas teniendo en cuenta las variables morfológicas analizadas. La barra de escala corresponde a 100 nm.

La fig. 5.11 muestra el gráfico Bi-plot de los *Scores* y *Loadings* de los resultados obtenidos teniendo en cuenta las variables morfológicas de las muestras de NSAg fabricadas usando las condiciones experimentales descritas en la sección 4.1 de la presente Tesis.

El análisis PCA entre los componentes 1 y 2 constituyen el 100 % de varianza total, lo que significa que el sistema depende de sólo dos componentes principales. No obstante como se puede observar en el gráfico Bi-plot de la fig. 5.11, el PC-1 representa el mayor porcentaje de varianza con un 98 % del total. Para *Loadings* positivos y con un valor moderado-bajo de PC-1 se ha encontrado la variable *d* (diámetro de la NP), que al mismo tiempo presenta valores moderados negativos para PC-2. Por otra parte, la variable *a* se encuentra para *Loadings* positivos y alto valor de PC-2, que corresponde a la longitud del brazo de la NP, mientras que la variable *d* (ancho de la punta del brazo de la NP) presenta valores de *Loadings* moderado-bajo para PC-2.

Teniendo en cuenta la distribución obtenida por la dispersión Bi-plot, se agruparon los *Scores* de las diferentes muestras formando clústeres. De esta manera se diferenciaron varios grupos de NPs con características morfológicas similares, entre los que se pueden destacar el clúster enmarcado por una elipse roja, donde se agrupan las NPs donde el tiempo T_1 en la síntesis de las nanoestrellas ha sido de 60 minutos, obteniéndose así NPs pequeñas facetadas, donde los brazos de las NS son muy cortos e incluso inexistentes. Otro grupo de *Scores* con características morfológicas similares lo forman el clúster enmarcado por la línea de color rosa que agrupa a NPs con un núcleo bien definido sobre el cual crecen brazos de las NPs con un tamaño mediano y una punta no muy delgada. La forma de este tipo de NPs se asemeja más a la forma de una flor como la margarita. Los *Scores* de los dos grupos de NPs (líneas de colores azul y turquesa) que se encuentran dispuestos hacia altos valores positivos de PC-1 corresponden a las NPs que presentan los mayores tamaños, con prolongaciones muy ramificadas y en ocasiones con morfología de espinapez. Mientras que en la posición contraria, a valores negativos de PC-1, se dispone el clúster enmarcado en rojo compuesto por las NPs más pequeñas, que a su vez son las menos ramificadas debido a que son NPs obtenidas con un mayor T_1 y/o una mayor concentración de Hx, por lo tanto queda una menor cantidad de átomos de plata para que la segunda reducción química, a cargo de citrato, dé lugar a la ramificación esperada.

5.1.4 Factor de intensificación SERS de las nanoestrellas

A. Nanoestrellas de plata

Con el propósito de evaluar la eficacia SERS de los coloides descritos en el capítulo anterior, se realizó un estudio del factor de intensificación para cada una de las muestras obtenidas. La intensificación de la señal Raman se estudió empleando dos moléculas de prueba, el tiofenol (TP) y la tioflavina T (ThT), ver fig. 5.12. Para el caso de las NSAg se empleó el TP como molécula de prueba, mientras que para las NSAgAu se utilizó la molécula de ThT.

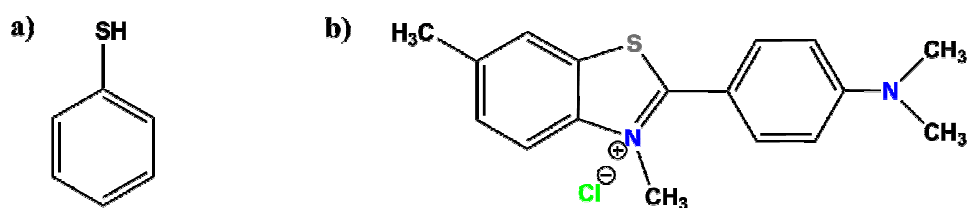


Figura 5.12: Fórmula química de las moléculas de prueba: a) tiofenol y b) tioflavina T

El TP presenta una alta afinidad hacia la superficie metálica de las NPs de Ag, formando enlaces covalentes con las mismas, a través de la formación de un enlace Ag-S con la subsiguiente ruptura del enlace S-H inicial [206]. Por lo que además de presentar una intensificación mediante LSPR se produce una intensificación por mecanismo químico, al haber una interacción covalente con formación de un complejo con el metal. También posee la característica de ser una molécula no resonante, es decir, no absorbe en la región del espectro visible. De esta manera la intensificación no se ve afectada por procesos de resonancia Raman. Mientras que para el caso de las NSH se utilizó como molécula de prueba la ThT. Pues la molécula de TP cambia su mecanismo de adsorción en dependencia del metal al que se adsorbe (Ag o Au) mientras que la ThT no. Este efecto se ha estudiado previamente en nuestro grupo de investigación donde el TP se ha utilizado como molécula de prueba en NPs *core@shell* Au@Ag, analizando los cambios en su espectro vibracional producto de los cambios de conformación inducidos por los diferentes metales [207]. El máximo de absorción de ThT es de 411 nm y los espectros SERS se obtuvieron a dos longitudes de onda de excitación diferentes 532 nm y 785nm. Estas dos líneas de excitación se emplearon con el objetivo de conocer la eficacia de las nuevas NSH en la intensificación SERS [143].

El cálculo del factor de intensificación (F_I) se realizó por comparación de la intensidad Raman del compuesto en disolución y en presencia de NPs, bajo las mismas condiciones de medida, a través de la fórmula:

$$F_I = \frac{I_{SERS}}{C_{SERS}} \times \frac{C_{dis}}{I_{dis}} \quad (5.1)$$

Donde I es la intensidad de una determinada banda en los espectros Raman y SERS, y C es la concentración de la molécula de prueba en disolución o en presencia de NPs (SERS).

Los espectros SERS del TP obtenidos a partir de las nanoestrellas de plata se muestran en la fig. 5.13. En líneas discontinuas se ha marcado la banda a 999 cm^{-1} correspondiente a la vibración 12 del anillo aromático de TP, según la notación de Wilson para las vibraciones normales del benceno [208, 209], pues fue la más intensificada en los espectros SERS sobre Ag. La tabla 5.3 presenta los valores del factor de intensificación para cada una de las muestras de NSAg fabricadas calculados usando la banda a 999 cm^{-1} .

Tabla 5.3: Valores del factor de intensificación (F_I) calculado para cada una de las diferentes NSAg fabricadas utilizando el TP como molécula de prueba.

NSAg	$F_I (\times 10^5)$	NSAg	$F_I (\times 10^5)$	NSAg	$F_I (\times 10^5)$	NSAg	$F_I (\times 10^5)$
105	21.52	305	16.31	505	51.51	705	8.04
130	2.15	330	360.01	530	9.04	730	7.36
160	1.94	360	17.62	560	4.37	760	24.07
205	12.57	405	17.70	605	21.56	805	6.28
230	6.62	430	18.64	630	30.51	830	24.81
260	1.82	460	0.20	660	25.14	860	6.36

Si la intensidad del espectro medido no es suficientemente fuerte, es posible distinguir varias bandas que ganan protagonismo con respecto a las bandas características de TP y que son características del citrato utilizado en la fabricación de las NPs. Estas bandas características del citrato aparecen sobre los 928 y 1390 cm^{-1} correspondientes a las vibraciones $\nu(\text{C-COO}^-)$ y $\nu_s(\text{COO}^-)$, respectivamente [210].

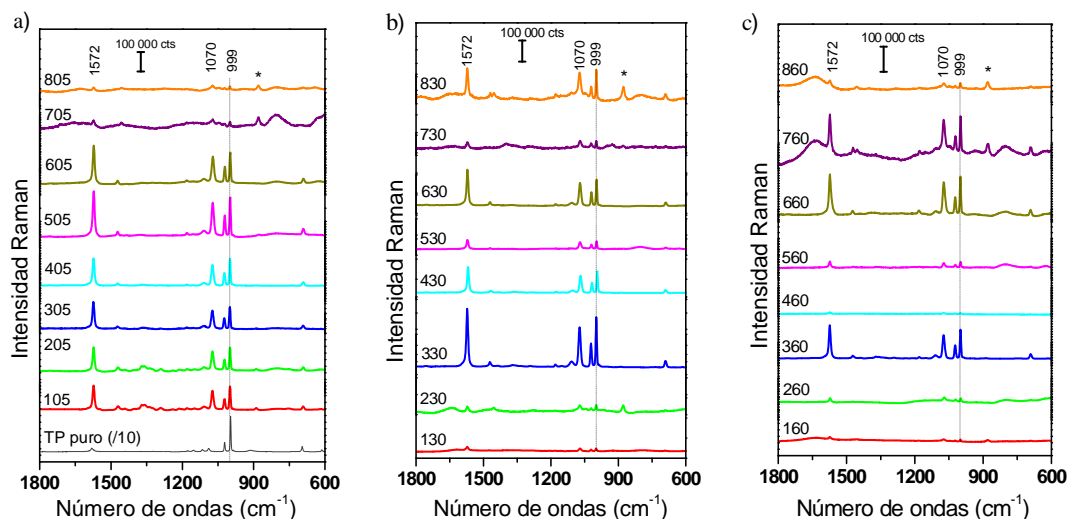


Figura 5.13: Espectros SERS del TP (1 μ M) empleando las nanoestrellas fabricadas como sustrato a los diferentes T_1 : 5 minutos (a), 30 minutos (b) y 60 minutos (c). *Banda que pertenece al etanol utilizado como disolvente del TP. Excitación a 532 nm.

Los espectros SERS de TP registrados en los coloides preparados usando un tiempo entre reducciones (T_1) de 5 min (fig. 5.13a), arrojaron valores de factor de intensificación que manifiestan una moderada variación entre sí en un intervalo comprendido entre 6.28×10^5 y 51.51×10^5 . Sin embargo, en el caso de los coloides donde T_1 fue 30 min (fig. 5.13b), el F_I experimenta una mayor variación oscilando en un intervalo que abarca hasta dos órdenes de magnitud entre sí. En esta serie de experimentos se obtuvo el mayor F_I (3.6×10^7) de todos los experimentos realizados, correspondiendo a la muestra 330. Finalmente, los menores valores de F_I , fueron observados para los coloides donde el valor de T_1 fue de 60 minutos (fig. 5.13c). En esta serie la muestra 460 presentó un valor de F_I igual a 2.0×10^4 , dos órdenes de magnitud por debajo de la media de todos los valores obtenidos.

Los coloides de AgNS han demostrado poseer una alta actividad SERS comparada con el coloide AgCT (nanoesferas de Ag), que presenta un F_I de 3×10^5 . Es importante recordar que las medidas realizadas para obtener el valor de F_I se efectuaron sin agente de agregación externa, tanto para los coloides de nanoestrellas como para el de nanoesferas de plata. La mayor intensificación registrada para nanoestrellas demuestra que estas nanopartículas presentan una mayor actividad SERS con respecto a las nanoesferas.

Relacionando los valores de F_I obtenidos con la morfología de las NPs fabricadas se puede llegar a conclusión de que el tiempo entre reducciones (T_1) influye de manera importante en las propiedades plasmónicas de las nanoestrellas. A medida que el tiempo transcurrido entre la primera reducción con Hx y la segunda con CT aumenta, el crecimiento de las NPs se ve drásticamente reducido, lo que da lugar a una menor actividad SERS del coloide. Por otro lado, entre los tiempos $T_1 = 5$ y 30 minutos, no se observaron diferencias significativas, sin embargo, en la serie correspondiente a $T_1 = 5$ min. los valores de F_I presentan una menor fluctuación. Por tal motivo se decidió utilizar las condiciones experimentales en las que $T_1 = 5$ min. para posteriores experimentos.

B. Nanoestrellas huecas bimetálicas

Los valores de F_I calculados para las nanoestrellas huecas (NSAgAu) utilizando ThT como molécula de prueba y dos longitudes de onda de excitación diferentes (532 y 785 nm), demuestra la versatilidad que presentan estas NPs como substratos SERS, ya que son activos en una amplia región del espectro Visible-NIR, (tabla 5.4). Se obtuvieron valores elevados de F_I para las tres muestras de NSAgAu estudiadas, mientras que para los casos de AuCT y AuNP sólo se pudieron obtener valores a 785 nm de excitación, debido a que presentan el máximo de extinción del plasmón en esta región del espectro (ver fig. 5.1a y 5.9c).

Tabla 5.4: Valores de F_I obtenidos para las nanoestrellas huecas bimetálicas fabricadas y nanoesferas de Au utilizando dos líneas de excitación 532 y 785 nm.

	NSAgAu1	NSAgAu2	NSAgAu3	AuCT	AuNP
$\lambda_{exc.} = 532 \text{ nm}$	5.92×10^3	8.17×10^3	1.29×10^4	No signal	No signal
$\lambda_{exc.} = 785 \text{ nm}$	2.28×10^5	1.21×10^4	3.57×10^3	2.92	1.35×10^5

La fig. 5.14 muestra la marcada diferencia observada entre los espectros de ThT sobre nanoesferas de oro (AuCT) y sobre las nanoestrellas huecas (NSAgAu2) en ausencia de agregación. Para que el coloide de AuCT presente una mayor actividad SERS requiere de una previa activación con un agente agregante externo, mientras que para el caso de las NSAgAu este paso no ha sido necesario debido a su morfología provista de un gran número de puntas. Por tal motivo los coloides de nanoestrellas

huecas representan una mejora sustancial en cuanto a intensificación SERS en relación con los coloides de NPs esféricas convencionales.

Por otra parte, del análisis de los espectros SERS se puede deducir también el mecanismo de interacción con el metal. Al ser la molécula de ThT compleja, puede presentar diferentes formas de adsorción sobre la superficie metálica de las nanopartículas [143]. Si se compara el espectro Raman de la molécula ThT en disolución acuosa, con los espectros SERS sobre nanoestrellas metálicas (fig. 5.14a), se puede observar una serie de cambios en el perfil espectral tales como: modificaciones en las intensidades relativas de algunas bandas, la aparición de nuevas bandas y el ensanchamiento o desplazamiento de bandas. En particular las bandas a 531, 698, 743, 795 and 1033 cm^{-1} aparecen intensificadas en los espectros SERS a todas las concentraciones. Varias de estas bandas pertenecen a la vibración $\delta(\text{CSC})$, por lo que su intensificación en el espectro SERS se debe a la interacción de ThT a través del átomo de azufre del anillo benzotiazol con la superficie del metal [143]. Además, el grupo de bandas a 1546, 1506 y 1400 cm^{-1} sufren una notable disminución en el espectro SERS con respecto al espectro en disolución de la molécula. Este decrecimiento de las bandas mencionadas se relaciona con un cambio estructural de la molécula de ThT.

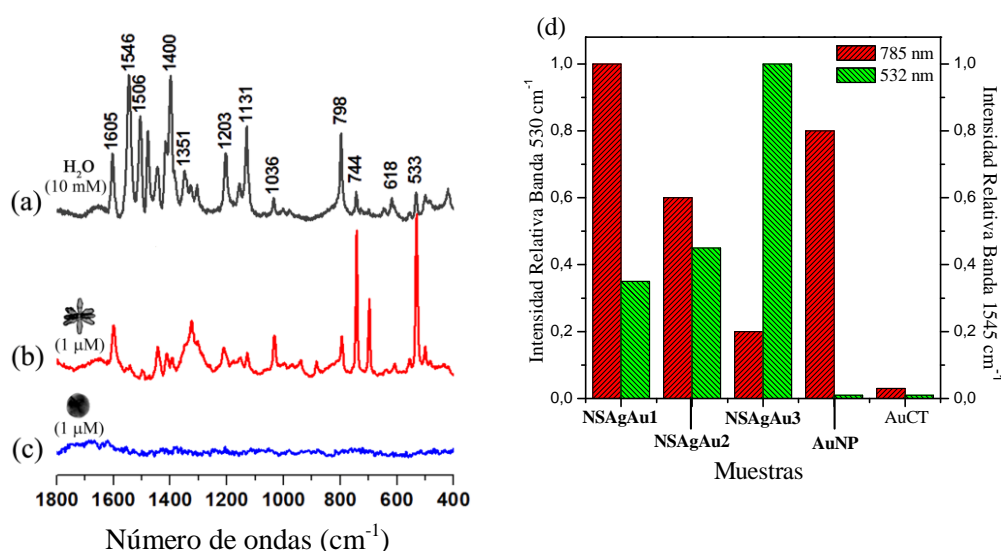


Figura 5.14: Espectro Raman de ThT 10 mM en disolución acuosa (a) y espectros SERS de ThT 1 μM sobre los coloides NSAgAu2 (b) y AuCT (c), excitación a 785 nm. (d) Intensidad SERS de ThT en dependencia de la longitud de onda de excitación y del coloide empleado. Estas intensidades se midieron utilizando líneas láser a 785 (barras rojas) y 532 nm (barras verdes). NSAgAu1, NSAgAu2, NSAgAu3, AuNP y AuCT corresponden a las muestras de la tabla 4.2.

La fig. 5.12b muestra que ThT está copuesta por dos grupos: un benzotiazol y un anillo de piridina unidos por un enlace C-C que puede rotar libremente. La interacción de ThT con la superficie metálica induce una rotación del enlace C-C que une dichos grupos, de tal forma que éstos se disponen formando un ángulo diedro mayor que el que existe en estado libre. Este cambio estructural tiene como consecuencia una drástica reducción de la resonancia electrónica entre los grupos aromáticos dando como resultado los cambios espectrales observados [143].

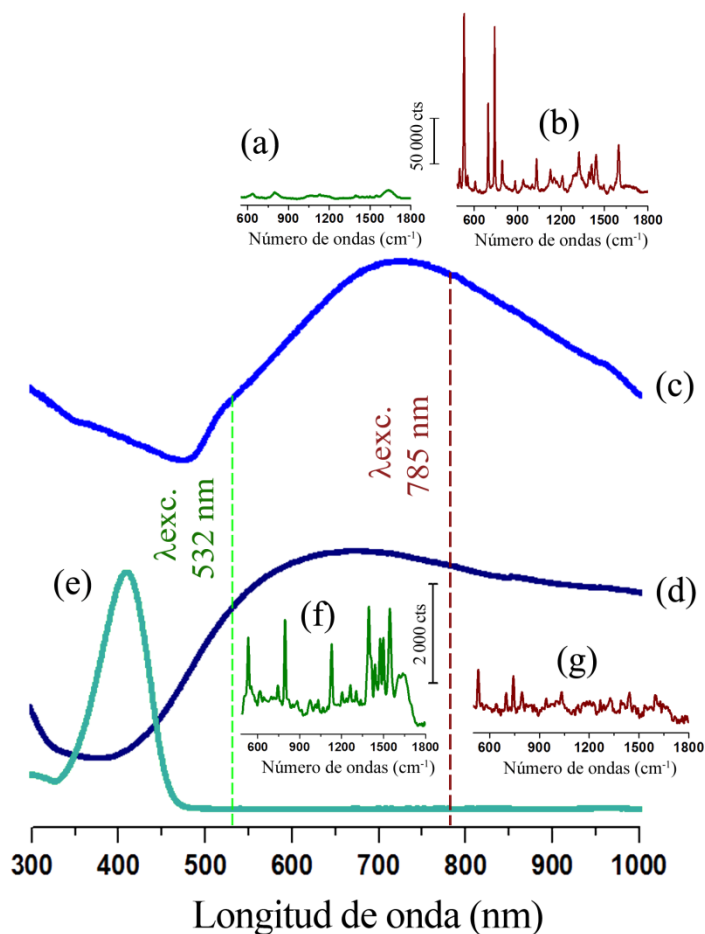


Figura 5.15: Espectros SERS de ThT (1 μ M) a diferentes longitudes de onda de excitación: 532 nm (a) y (f), a 785 nm (b) y (g) sobre los substratos NSAgAu1 y NSAgAu3 respectivamente. Espectros de extinción de las muestras NSAgAu1 (c) y NSAgAu3 (d). Espectro de absorción de ThT (10 mM) en agua (e).

Las intensidades relativas de algunas bandas también pueden verse afectadas debido a la influencia de las diferentes longitudes de onda de excitación sobre el plasmón y la resonancia molecular. La fig. 5.15 muestra los espectros SERS de ThT a una concentración de 1 μ M, utilizando dos longitudes de onda de excitación diferentes (532 y 785 nm) y sobre distintos substratos de nanoestrellas (NSAgAu1 y NSAgAu3).

Se muestra también el espectro de absorción de ThT a modo de comparación. La realización de este tipo de experimentos permitió el análisis del posible mecanismo de adsorción de la molécula sobre las NPs.

Empleando NPs de la muestra NSAgAu1 y una línea de excitación de 785 nm, el espectro SERS que predomina se corresponde a una capa de moléculas de ThT adsorbidas directamente sobre la superficie metálica, puesto que se ha observado una intensificación de las bandas que aparecen en la región a bajos número de ondas en el espectro SERS (fig. 5.15a). Mientras que con la línea de excitación a 532 nm el espectro SERS obtenido presenta una intensificación de las bandas mucho menor si se compara con el obtenido a 785 nm de excitación. Este comportamiento se atribuye a la baja extinción que presenta el espectro del plasmón para el sustrato NSAgAu1 a esta longitud de onda. Sin embargo, para el coloide NSAgAu3, la situación cambia y ahora el espectro más intenso es el SERS usando la línea a 532 nm debido a la mayor proximidad de la resonancia de plasmón de este coloide a esta línea. Por otra parte, con esta excitación las bandas de bajo número de ondas (por debajo de 1000 cm^{-1}) son mucho menos intensas, debido a que la línea de excitación a 532 nm se sitúa en la ladera izquierda de la banda de extinción.

5.1.5 Caracterización mediante SERS de la composición química de la corteza de las nanoestrellas huecas bimetalicas

Otro aspecto que se tuvo en cuenta a la hora de caracterizar las nanopartículas huecas mixtas fue la composición metálica de la corteza de las nanopartículas. Este estudio se puede realizar mediante SERS empleando adsorbatos cuyos espectros sean diferentes sobre Ag y Au. Ese es el caso de la molécula lucigenina, que presenta espectros SERS perfiles espectrales diferentes cuando está en presencia de oro o de plata [207].

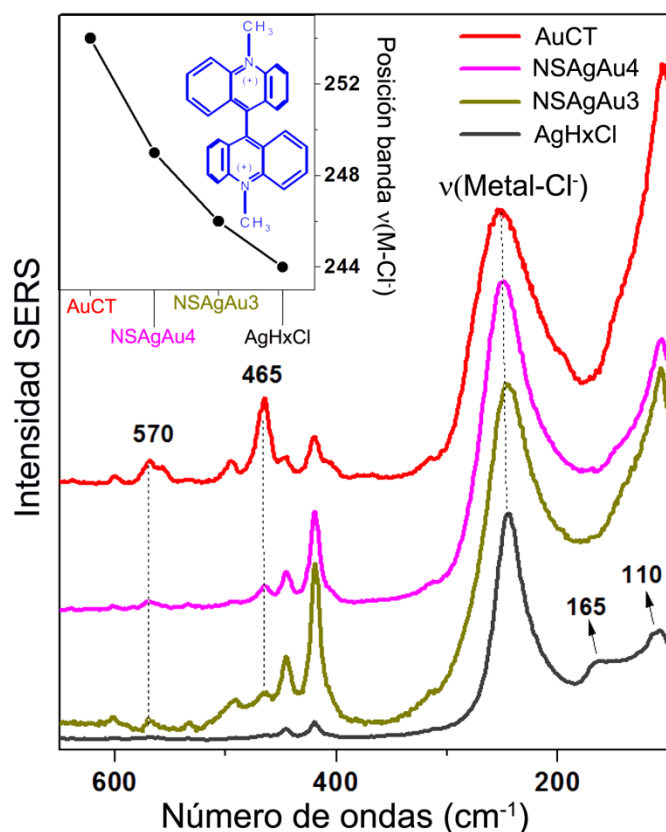


Figura 5.16: Espectros SERS de la lucigenina en la región espectral a bajo número de ondas donde se ve reflejada la banda de interacción Metal-Cl⁻. *Insertado:* Estructura química de la lucigenina y la dependencia de la posición de la banda $\nu(\text{Metal-Cl}^-)$ en los espectros SERS utilizando diferentes NPs; excitación a 785 nm. Los espectros se obtuvieron realizando dos barridos a 10 s de tiempo de integración cada uno, con una potencia del láser de 0.5 mW.

La fig. 5.16 muestra los espectros SERS de la lucigenina en la región espectral a bajos número de ondas, donde se localizan las bandas de vibración características relacionadas con la interacción Metal-Cl⁻. En numerosos trabajos [9, 74, 211] se ha visto que la posición de la banda de tensión Metal-Cl⁻ ($\nu(\text{Metal-Cl}^-)$) varía dependiendo de la naturaleza del metal y de la presencia de otras especies sobre la superficie del metal que puedan interaccionar bien con el metal directamente, bien con el cloruro. Por lo tanto, la posición de la banda $\nu(\text{Metal-Cl}^-)$ depende fuertemente del metal, ya que se observa a 244 cm⁻¹ en Ag y a 254 cm⁻¹ en Au (figura insertada en fig. 5.16). Esta banda alcanza valores intermedios entre los anteriores dependiendo de la cantidad relativa de ambos metales. Por lo tanto, el análisis de esta banda permite estimar de manera aproximada la relación Au/Ag. Como se puede observar en la gráfica insertada de la fig. 5.16, la posición de la banda $\nu(\text{Metal-Cl}^-)$ trazada para las diferentes NPs utilizadas, muestra un desplazamiento de la banda hacia valores

menores de número de ondas a medida que disminuye la cantidad de oro en la corteza de las NPs.

Otro efecto interesante que se observó en las nanopartículas huecas por la presencia de Au fue la desaparición de las bandas a 165 y 110 cm^{-1} (asociadas a la existencia de clústeres de Ag en las NPs de Ag) [63]. Por otra parte, la intensificación de las bandas SERS de la lucigenina en presencia de NPs de Au (465 y 570 cm^{-1}), junto con la existencia de las bandas características de la LG sobre Ag, sugieren la presencia simultánea de ambos metales (Au y Ag) en la corteza de las nanoestrellas huecas fabricadas. Por lo tanto, de este resultados se deduce que ambos metales forman una auténtica aleación.

Para verificar la naturaleza bimetalica de la corteza de las NSH se empleó la espectroscopía de difracción de rayos-X (EDX). El espectro EDX (fig. 5.17a) muestra claramente la presencia de átomos de Ag y Au en la muestra NSAgAu3 mediante la presencia de las señales correspondientes a los metales Ag y Au que aparecen a 3.1 keV para la línea Ag-L y a 2.1 , 9.7 y 11 keV para las líneas Au-M, Au-L α y Au-L β , respectivamente [94, 212]. De esta forma se ha evidenciado que la corteza de las NSAuAg está compuesta por una aleación de Ag y Au, proveyendo a las NSH de determinadas características que se pueden ajustar en dependencia de las necesidades de los sistemas en los cuales se pretenda utilizar.

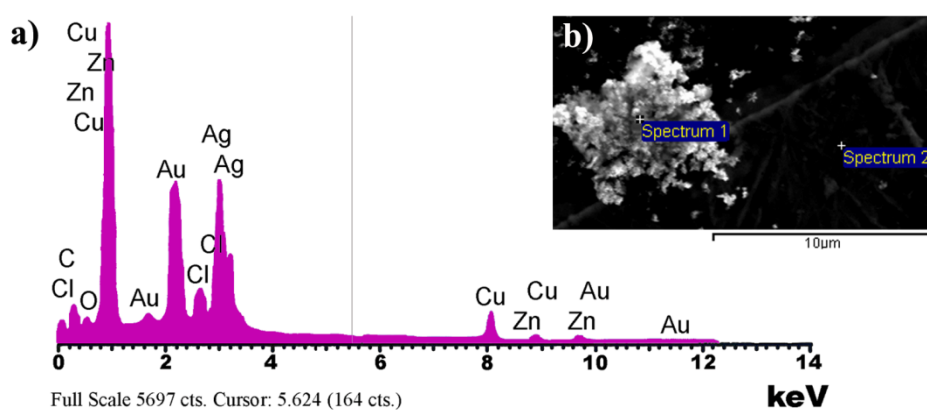


Figura 5.17: Espectro EDX (*Spectrum 1*) de la muestra NSAgAu3 (a) e imagen de la zona de la muestra donde se efectuó la medida EDX (b)

En esta Tesis se han utilizado varias de las nanopartículas NSAg y NSAgAu obtenidas para su aplicación como sustratos SERS en el estudio de determinadas moléculas con gran interés biológico como se verá en secciones posteriores.

5.2 ESTUDIO DE SUSTANCIAS MARCADORAS BIOLÓGICAS: ADSORCIÓN SOBRE NANOPARTÍCULAS Y ESPECTROS SERS

Los resultados que se presentan en esta sección se centran en el estudio de dos colorantes histológicos Rojo Congo (CR) y la tioflavina T (ThT) (ver fig. 5.18), marcadores de agregados de β Am utilizando como substratos SERS las nanopartículas metálicas fabricadas en esta Tesis. Estos colorantes presentan una alta afinidad por agregados fibrilares que pueden formar algunos tipos de péptidos en determinadas condiciones fisiológicas [213-216].

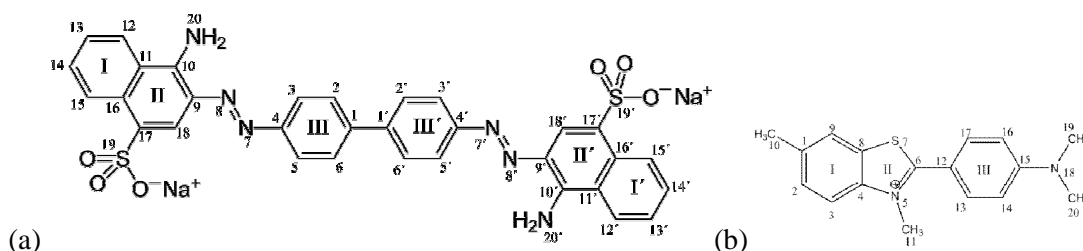


Figura 5.18: Estructuras moleculares y numeración de los átomos de los colorantes histológicos marcadores de agregados de β -Amiloide: Rojo Congo (a) y tioflavina T (b).

Las nanopartículas metálicas se han utilizado para inducir la agregación de los péptidos en algunos casos y otras veces para evitar la agregación y formación de fibrillas [217-219]. Los colorantes histológicos CR y ThT se han empleado para la detección de estas fibrillas amiloideas [216, 220-223]. La detección de estos fenómenos de agregación depende por lo tanto de las propiedades ópticas de estos marcadores, como por ejemplo la facultad de emitir fluorescencia el ThT en presencia de fibrillas amiloideas. Por lo tanto el estudio de la adsorción de estos marcadores en NPs plasmónicas podría ser empleado con el fin de aumentar el poder de detección de los mismos en el ámbito del biodiagnóstico en bioanálisis de tipo indirecto.

5.2.1 SERS de las sustancias marcadoras biológicas

En la fig. 5.19A se comparan los espectros SERS de CR obtenidos sobre las distintas NPs metálicas con los espectros FT-Raman del compuesto sólido y en disolución. En ellos se puede observar un ligero cambio en las intensidades relativas de las bandas más intensas. La principal diferencia que presentan los espectros FT-Raman entre ellos es el desplazamiento de la banda a 1353 cm^{-1} , correspondiente a la

vibración $\nu(\text{C}_{11}=\text{C}_{16})$, en el sólido hasta 1377 cm^{-1} debido a que en disolución la interacción entre moléculas se ve favorecida a través de los anillos aromáticos que la conforman.

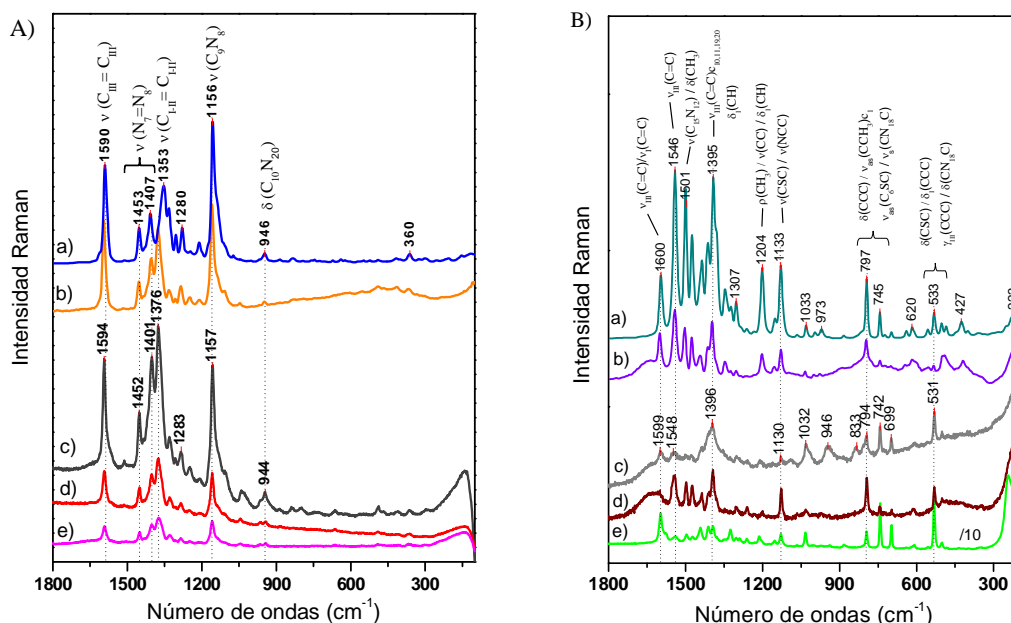


Figura 5.19: Espectros FT-Raman y SERS de los colorantes histológicos: Rojo Congo (A) y tioflavina T (B). Espectros FT-Raman del sólido (a) y en solución acuosa 10 mM (b), para ambas moléculas respectivamente. Espectros SERS a 532 nm de excitación utilizando diferentes sustratos: NSAg305 (c), NSAgAu3 (d) y AgHxCl (e), para ambos colorantes respectivamente. En todos los experimentos SERS la concentración de ThT fue de 1 μM , menos para el caso de la ThT en presencia de NSAg305 (espectro c del gráfico B) que fue de 10 μM .

En el espectro FT-Raman en disolución (10 mM) las bandas a 1591 cm^{-1} asignada a $\nu(\text{C}_1=\text{C}_1)$ y a 1157 cm^{-1} $\nu(\text{C}_9-\text{N}_8)$ presentan una mayor intensidad relativa comparada con las bandas que aparecen a 1401 y 1373 cm^{-1} debidas a la vibración $\nu_s(\text{N}_7=\text{N}_8)$. Sin embargo, en los espectros SERS del CR estas últimas bandas, que aparecen a 1401 y 1376 cm^{-1} , se intensifican en relación con las bandas a 1594 y 1157 cm^{-1} . También se observa una intensificación de las bandas que se encuentran por debajo de 1000 cm^{-1} sobre todo la banda de 944 cm^{-1} que está relacionada con la vibración $\delta(\text{C}_{10}-\text{N}_{20})$. Este comportamiento se asocia a la interacción de CR con la superficie metálica a través de los grupos *azo* ($-\text{N}=\text{N}-$).

Los espectros SERS del CR presentan en todos los casos una buena relación señal/ruido. Sin embargo, la intensidad sobre el coloide NSAg305 es mucho mayor.

Además, para este coloide se detectó una concentración más baja de CR. Por tal motivo se decidió llevar a cabo los estudios SERS de este colorante empleando las nanoestrellas de Ag.

El estudio espectroscópico de la molécula de ThT se realizó siguiendo las mismas pautas descritas anteriormente para CR. La fig. 5.19B muestra los espectros FT-Raman y SERS de ThT sobre diferentes coloides de NPs metálicas. El espectro Raman en disolución acuosa muestra las bandas características de la molécula a 1600, 1546, 1501, 1395, 1204, 1133, 797 y 533 cm^{-1} . Estas bandas se corresponden también con las bandas que aparecen en el espectro FT-Raman de la molécula ThT en estado sólido y en disolución acuosa, ver fig. 5.19B (espectros (b) y (a)) respectivamente.

En estudios anteriores realizados en nuestro grupo se caracterizó en detalle el proceso de adsorción de la molécula de ThT sobre la superficie de NPs esféricas de plata [224]. Según los mismos la molécula de ThT se adosorbe sobre Ag dando lugar a dos formas: ThT₁ y ThT₂, que corresponden a la molécula directamente adsorbida sobre el metal (ThT₁) y la molécula adsorbida en multicapas por encima de la primera (ThT₂).

En la presente Tesis se ha investigado la interacción de ThT utilizando las nanoestrellas NSAg305 y NSAuAg3 como sustratos SERS para así comparar los nuevos resultados con los ya obtenidos anteriormente. A diferencia de CR, el colorante ThT presenta unos espectros SERS más débiles cuando se usan las NS como soportes. El espectro SERS sobre NSAg305 (fig. 5.19Bc) está claramente dominado por el citrato usado en la fabricación de estas NPs. La intensidad SERS mejora sustancialmente sobre las NSAuAg3 (fig. 5.19Bd), sobre estas NS se observa que el perfil del espectro se corresponde con la forma ThT₂ del colorante en esas condiciones (bandas a 1544, 1500, 1473, 1124 y 793 cm^{-1}). Lo que indica que en estas condiciones el colorante no interacciona directamente con el metal, sino que se sitúa por encima a cierta distancia, posiblemente interaccionando con el citrato que recubre la superficie metálica de estas NPs. Por lo tanto, el citrato existente sobre la superficie evita que la molécula de ThT pueda interaccionar con el metal, puesto que la molécula de ThT no es capaz de desplazar al CT de la superficie de las NPs y situarse cerca de la superficie de las NPs [207, 225]. Sin embargo, el espectro SERS de ThT sobre AgHxC1 presenta intensas bandas a 1597, 1032, 741, 698 y 531 cm^{-1} , que revelan una interacción directa

con el metal, facilitada por la presencia de iones Cl^- , con quienes el grupo amino protonado de la parte anfílica de la molécula puede interaccionar vía pares iónicos.

5.2.2 Análisis cuantitativo y detección de las moléculas marcadoras biológicas mediante SERS

El análisis cuantitativo de los colorantes se llevó a cabo a partir de los espectros SERS obtenidos a diferentes concentraciones. Este tipo de análisis no solamente permite conocer el límite de detección de los colorantes sino también la identificación del mecanismo de interacción de la molécula con la superficie de las NPs. Para ello, se utilizó como sustrato SERS el coloide de NSAg305 para el colorante CR, ya estos sistemas fueron los que dieron lugar a los espectros más intensos, sin que fuera necesaria la adición de un agente que potenciara la agregación de las NPs. Mientras que para el caso de la molécula ThT se utilizó el coloide NSAgAu3, para el que tampoco es necesaria una agregación del coloide.

I. Adsorción de los colorantes histológicos sobre las nanoestrellas fabricadas en este trabajo

En esta sección se estudia la adsorción de las moléculas CR y ThT desde un punto de vista cuantitativo, partiendo de las condiciones óptimas deducidas de los experimentos anteriores empleando para ello la espectroscopía SERS a varias concentraciones del adsorbato y las isothermas de adsorción correspondientes.

La banda de referencia es un tema crucial en esta investigación, ya que permite contrarrestar el posible efecto de la agregación de NPs provocado por la adición de las diferentes especies para el análisis. En los experimentos con colorantes histológicos se utilizó dimetil sulfóxido (DMSO) al 10 % (v/v) como referencia externa. Para estos sistemas específicamente el disolvente DMSO no interviene ni compite con la molécula estudiada en la adsorción sobre la superficie metálica.

En la fig. 5.19 se representan las intensidades de las bandas marcadoras de los espectros SERS de CR y ThT estudiados en presencia de NSAg305 y NSAgAu3 respectivamente, en función de la concentración del colorante. Como ya se ha explicado en capítulos precedentes estas gráficas constituyen auténticas isothermas de

adsorción. Las bandas marcadoras seleccionadas son las que aparecen a 1590 cm^{-1} para el CR y a 1545 cm^{-1} para la ThT. Las intensidades de estas bandas marcadoras se compararon con la intensidad de la banda que aparece a 678 cm^{-1} , que se empleó como referencia y que corresponde a la vibración $\nu(\text{S-C})$, proveniente del DMSO añadido como referencia externa a una concentración final del 10 % v/v. No se realizaron ajustes de pH en los experimentos SERS, por lo que se trabajó al pH del coloide utilizado. Tampoco se adicionó ningún agente de agregación externo.

A partir de estas isothermas de adsorción se calcularon los parámetros cuantitativos asociados a la adsorción, es decir, la constante de adsorción (K_{ad}), relacionada con la afinidad de la molécula por la superficie, la intensidad SERS máxima (I_{sm}) y la máxima concentración de sustancia adsorbida ($[A]_m$), variables éstas que representan el límite superior de concentración detectable, el cual está relacionado a su vez con la superficie total de adsorción disponible sobre todas las nanopartículas ofrecidas al analito.

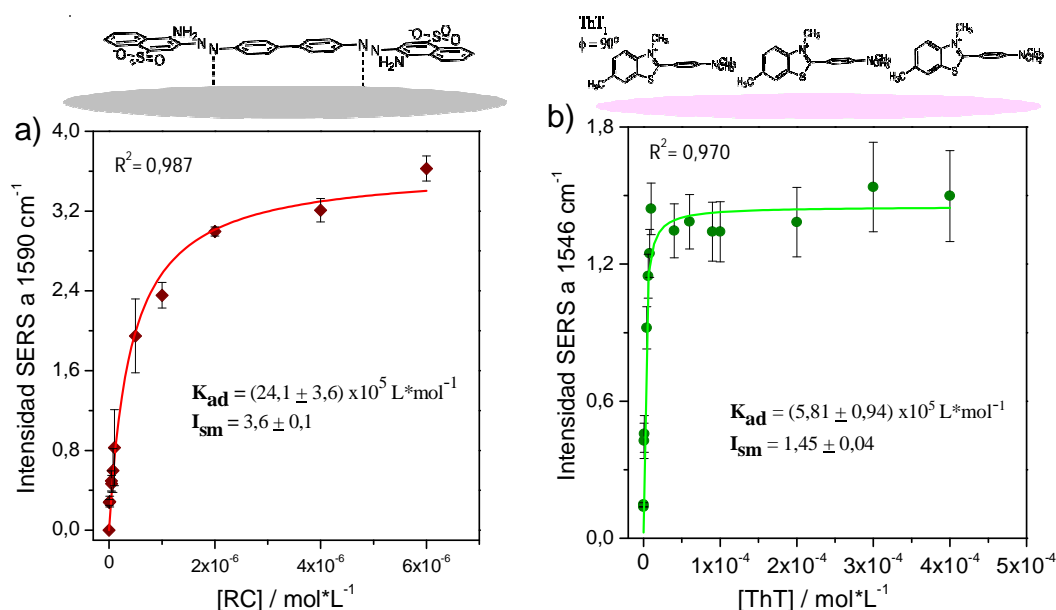


Figura 5.20: Representación de la intensidad SERS frente a la concentración de adsorbato y ajuste realizado para los datos experimentales SERS para: Rojo Congo sobre NSAg305 (a) y tioflavina T sobre NSAgAu3 (b). Insertado: Posible mecanismo de adsorción sobre la superficie metálica propuesto a partir del análisis de los espectros SERS. Excitación a 532 nm.

A partir de los gráficos que muestra la fig. 5.20a se deduce que el colorante Rojo Congo presenta un modelo de adsorción sobre la superficie del tipo Langmuir. Este comportamiento implica una saturación de la intensidad a partir de una concentración

de 2 μM , que se corresponde con la saturación que alcanza la superficie metálica. Por debajo de una concentración de 1 μM , se tiene una dependencia lineal a bajas concentraciones. Esto indica que las moléculas que siguen este modelo presentan una adsorción sobre las NPs metálicas sin que haya interacciones intermoleculares significativas.

El ajuste anteriormente descrito permitió obtener los parámetros de adsorción K_{ad} y I_{sm} los cuales se muestran insertados en el gráfico para el caso del CR (fig. 5.20a).

Por otro lado, analizando los espectros SERS de CR a diferentes concentraciones y la isoterma de adsorción de la molécula sobre la superficie, se propuso un posible mecanismo de interacción con las NPs (ver esquema superior de la fig. 5.20a) a través de la interacción de los grupos *azo* de la molécula con la superficie de las NPs. Este tipo de adsorción implica que no existe crecimiento de multicapas de CR sobre la superficie, o bien que la energía de interacción intermolecular es despreciable frente a la de adsorción de CR sobre el metal.

Para el caso de la tioflavina T se observó que el perfil de la curva I_S vs. $[ThT]$ se ajusta también a un comportamiento del tipo Langmuir (fig. 5.20b), donde las moléculas alcanzan un máximo de saturación a una concentración de 8×10^{-6} M. Como ya se comentó en la sección 2.7.1, la molécula de ThT se puede comportar como un “rotor molecular” en el que bajo determinadas condiciones, el enlace C-C que une las dos mitades aromáticas de la molécula se disponen formando un ángulo de 90° . Esto hace que se pierda la conjugación de los electrones π de los sistemas aromáticos y es esta la configuración que adopta la ThT sobre la superficie de las NSAgAu3 formando la primera monocapa [224]. Al igual que para el CR se propuso un mecanismo de interacción de ThT con la superficie de las NPs teniendo en cuenta el análisis de los espectros SERS y la isoterma de adsorción. La adsorción de la ThT sobre la superficie metálica sugiere que ésta se produce a través del átomo de azufre adoptando una orientación perpendicular el anillo benzotiazol con respecto a la superficie. Mientras que la mitad aminobenceno adopta una orientación paralela a la superficie debido a la interacción del metal con el átomo de N y el sistema de electrones π del anillo de benceno, lo que implica que ambas mitades aromáticas se dispongan formando un ángulo de 90° entre sí. El esquema propuesto se muestra en la parte superior de la fig. 5.20b.

II. Límite de detección de los colorantes histológicos

Para la molécula de CR la región de linealidad abarca un intervalo de concentraciones desde 5×10^{-9} hasta 10^{-7} M (fig. 5.21a). Mientras que para la adsorción de ThT sobre NSAgAu3 esta región de linealidad es más amplia comparada con el CR y abarca un intervalo de concentraciones desde 7×10^{-7} hasta 10^{-5} M (fig. 5.21b).

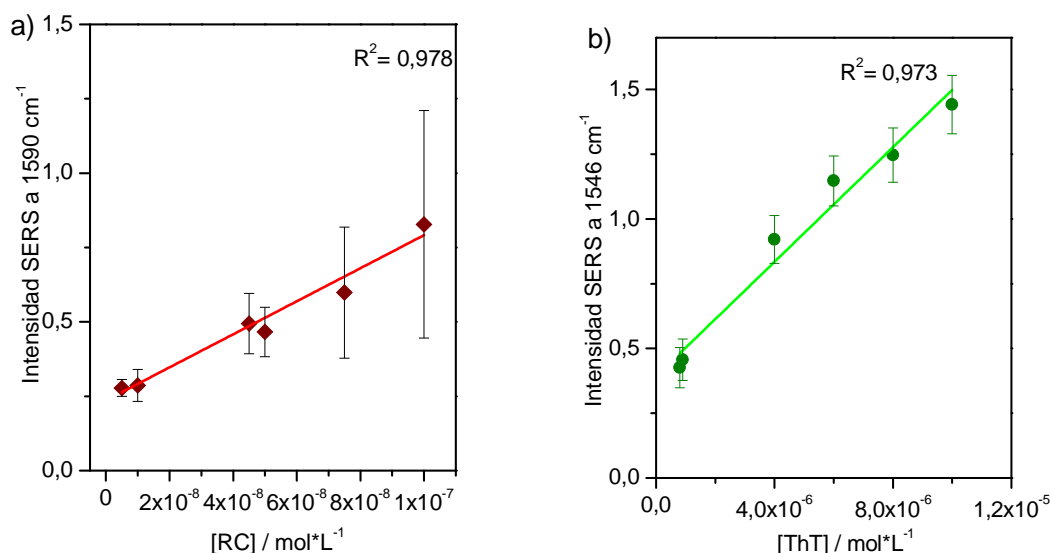


Figura 5.21: Recta de calibrado donde se representa I_{SERS} frente a la concentración de analito: Rojo Congo sobre NSAg305, (5×10^{-9} - 10^{-7} M) (a) y tioflavina T sobre NSAgAu3 (7×10^{-7} - 10^{-5} M) (b). Excitación a 532 nm

Las ecuaciones correspondientes al ajuste lineal para ambos casos se muestran a continuación:

CR sobre NSAg305	$I_s = (5.6 \pm 0.5) \times 10^6 \cdot [\text{CR}] + (0.24 \pm 0.03) \quad r^2 = 0.978$
ThT sobre NSAgAu3	$I_s = (1.1 \pm 0.9) \times 10^5 \cdot [\text{ThT}] + (0.39 \pm 0.06) \quad r^2 = 0.973$

Los valores de la pendiente en ambos casos son elevados aunque para el CR la sensibilidad de la detección es mayor que para el caso de ThT. Este comportamiento puede estar relacionado con la forma de adsorción que presentan los colorantes sobre la superficie, ya que el CR interacciona directamente sobre el metal mediante la formación de enlaces covalentes entre los grupos *azo* y el metal. Por este motivo, la sensibilidad de la técnica SERS para el CR es relativamente elevada pues el límite de detección en este caso es de 28,4 ppb. Este valor es menor que el obtenido mediante otras técnicas analíticas como la cromatografía líquida de alta precisión (HPLC)

acoplada a un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo cuadrupolar (LC-QTOF MS) [226] o la espectrofotometría UV-visible [227]. Por otro lado la sensibilidad de la técnica para la detección de la molécula de ThT es mucho menor si se compara con la obtenida para el CR y el límite de detección obtenido fue de 609 ppb. Este valor es superado por técnicas como la espectrofotometría UV-visible que consiguen determinar ThT en el orden de 240 ppb ligeramente menor que el obtenido por la técnica SERS [228], lo que también se atribuye al hecho de que el citrato de las NSAgAu impide la adsorción del colorante.

Por lo tanto, se puede decir que el estudio cuantitativo SERS de los colorantes histológico CR y ThT proporciona resultados relativos al límite de detección comparables con otras técnicas analíticas convencionales, concretamente la cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas en tándem. Estos resultados son altamente prometedores en lo que concierne a la posible aplicación de estos colorantes en la detección de agregados de β -Amiloide mediante el uso de la espectroscopía SERS en medidas indirectas.

5.3 ADSORCIÓN DE PÉPTIDOS FIBROGÉNICOS SOBRE NANOPARTÍCULAS PLASMÓNICAS

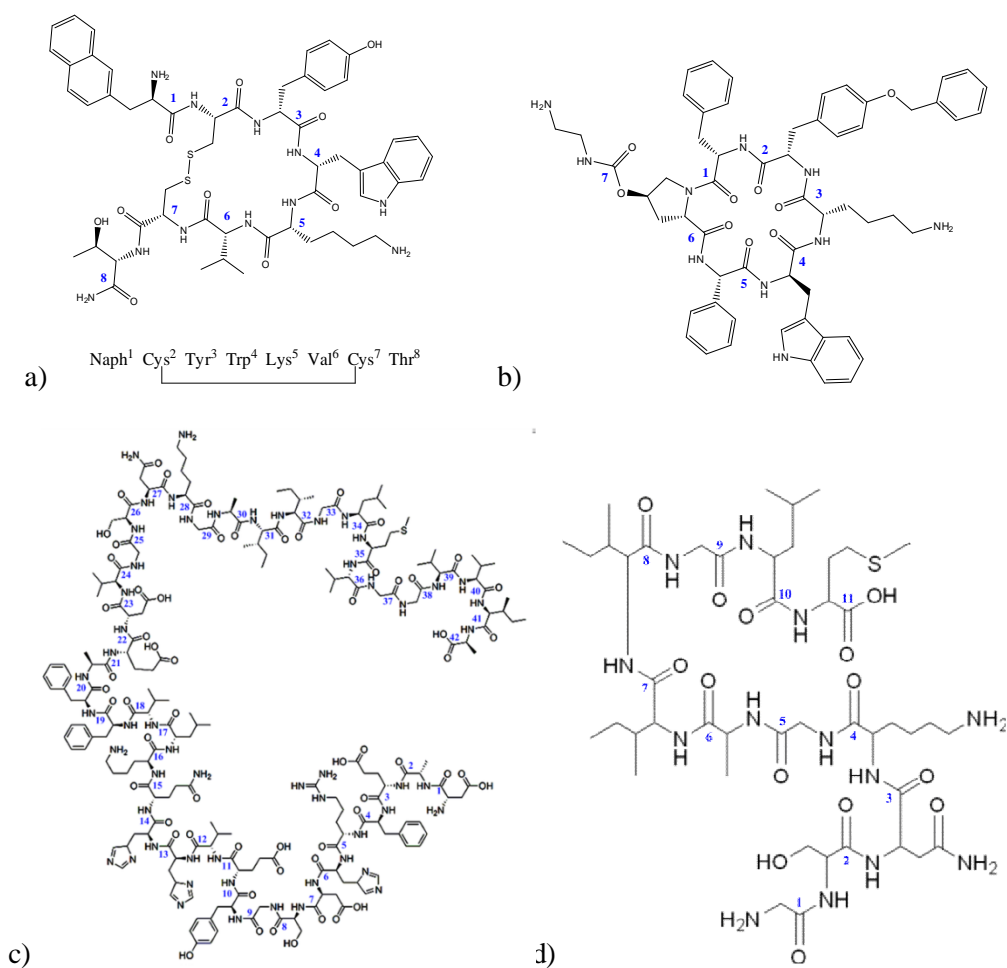
Los resultados que se presentan en esta sección incluyen los experimentos realizados utilizando nanopartículas metálicas plasmónicas como substratos SERS en la caracterización y estudio de un grupo de moléculas biológicas de gran interés como son los péptidos fibrogénicos.

Se analizaron tres tipos de péptidos diferentes:

- ✓ Lanreótido (LAN), fig. 5.22a.
- ✓ Pasireotide (SOM-230), fig. 5.22b.
- ✓ Diferentes fragmentos de β -Amiloide: 1-42, 1-40 (fig. 5.22c) y 25-35 (fig. 5.22d).

El lanreótido y el SOM-230 son péptidos terapéuticos de naturaleza sintética de acción prolongada en el organismo análogos a la somatostatina. Estas sustancias son utilizadas en el tratamiento de la acromegalia y tumores neuroendocrinos [145-148]. Por otro lado, tanto el β -Amiloide como el lanreótido presentan una característica en común, ya que se ha demostrado en anteriores investigaciones que son capaces de

formar fibrillas bajo determinadas condiciones fisiológicas [147, 149-151, 159, 161, 229]. Por lo tanto, dicho lo anterior, en esta sección se pretende estudiar la adsorción de estos péptidos sobre NPs con determinadas características y analizar el efecto de las mismas sobre la posible formación de agregados de los péptidos mencionados anteriormente. Asimismo, se muestran los resultados encontrados mediante la técnica SERS en la caracterización y determinación del mecanismo de interacción péptido-NP metálica y la detección de estas moléculas biológicas a muy bajas concentraciones en determinaciones cuantitativas.



Optimización de los sistemas metálicos plasmónicos

El primer paso de esta optimización lo constituyó la selección de aquellos sistemas coloidales capaces de rendir una mayor señal SERS. Entre las NPs de morfología esférica, las de Ag obtenidas por reducción con clorhidrato de hidroxilamina (HxCl) resultaron ser las más activas, mientras que las NPs obtenidas con el citrato no mostraron ninguna efectividad SERS. Este efecto se atribuye a la presencia de citrato en la superficie de las NPs resultantes, lo que obstaculiza el acercamiento de la molécula a la superficie debido a la presencia de cargas negativas en la interfase metal-molécula. Desafortunadamente, las nanoestrellas de Ag mencionadas en la sección 4.3.1, resultaron ser ineficaces en la adsorción de estos péptidos debido también al alto contenido de citrato que poseen estos sistemas. En el caso de las NPs de Au, también se obtuvo un resultado negativo al aplicar estos sistemas a los péptidos LAN y SOM230. Como no es posible la obtención de NPs con el reductor HxCl, se procedió a la fabricación de coloides de Au con concentraciones de citrato reducidas, utilizando el método descrito por Frens [230]. Finalmente el coloide de Au que dio unos mejores resultados fue el obtenido a las condiciones mostradas en la tabla 4.2 de la sección 4.3.2. Estas condiciones experimentales dieron lugar a NPs de oro esféricas con un diámetro medio de 50 nm, con la ventaja adicional de presentar una menor cantidad de moléculas de citrato en la interfase NP-péptido.

Las interacciones que se producen entre las proteínas y los péptidos con la superficie de las nanopartículas metálicas son complejas y de diferente naturaleza, ya que estos compuestos presentan numerosos puntos de unión con el metal y su estructura determina en gran medida la organización del péptido sobre la nanopartícula [173, 231]. La interpretación de los espectros SERS permite dilucidar este mecanismo de unión a partir de la asignación de las bandas correspondientes siendo posible recabar información sobre dicha organización molecular gracias a las características propias del efecto SERS (efecto de corto alcance de la intensificación, reglas de selección, etc.) tal como se indicó en la sección 2.3.1 del capítulo 2.

5.3.1 Adsorción del péptido Lanreótido sobre NPs metálicas

Los espectros SERS del péptido lanreótido se registraron utilizando como sustrato las NPs de plata y oro de morfología esférica. Debido a que la relación señal/ruido

tanto de las NSAg como las NSAuAg obtenidas en esta Tesis fue muy baja para las medidas SERS del péptido LAN. Este efecto se atribuye, como se ha mencionado anteriormente, a la presencia de citrato sobre la superficie del metal, ya que el tipo de interface de las NPs en disolución ejerce un papel importante en la adsorción de los péptidos sobre la superficie metálica. Un estudio previo, realizado en nuestro grupo de investigación sobre la Somatostatina (SST-14) en presencia de NPs esféricas de oro y plata muestra una alta afinidad del péptido SST-14 por la superficie metálica [232]. Por lo tanto, los resultados obtenidos en el trabajo anterior se utilizaron como punto de referencia en el estudio de los péptidos LAN y SOM-230 ya que son análogos a la SST-14.

I. Espectros de extinción

La fig. 5.23 muestra los espectros de extinción del péptido LAN en presencia de los coloides de nanopartículas esféricas de plata. Como puede apreciarse, el péptido induce por sí mismo la agregación de las NPs metálicas. Este efecto da lugar a la aparición de una segunda banda de extinción a 780 y 820 nm para AgHxCl que se corresponde con la Banda *L* de agregados (sección 2.5). El efecto sobre la agregación de NPs del péptido también se investigó en presencia de KNO₃ como agente agregante, el cual fue añadido a continuación del péptido para asegurar la adsorción previa del mismo. En presencia de KNO₃ se aprecia un menor desplazamiento del máximo de extinción hacia más altas longitudes de onda, mientras que la agregación es más extensa a bajas concentraciones (fig. 5.23b) lo que indica una agregación más fuerte que permite bajar el límite de detección.

En la fig. 5.23c se muestra la variación de la posición del máximo de extinción de la Banda *L*. A medida que aumenta la concentración del péptido añadido se produce un desplazamiento de esta banda hacia mayores longitudes de onda. Esta tendencia se produce hasta una concentración micromolar del péptido, a partir de la cual el máximo se desplaza hacia menores longitudes de onda. Este comportamiento obedece al patrón de agregación universal RLCA/DLCA, descrito por Lin y col. [233], según el cual a concentraciones por debajo de 10⁻⁶ M de adsorbato se produce una agregación predominantemente lineal de NPs de Ag. Este tipo de agregación se ha podido observar en las imágenes de TEM (fig. 5.23e) y se debe al elevado potencial zeta

residual existente en las NPs a estas concentraciones, lo que obliga a las NPs a disponerse en forma de cadenas para minimizar la repulsión entre nanopartículas [9, 10, 234, 235].

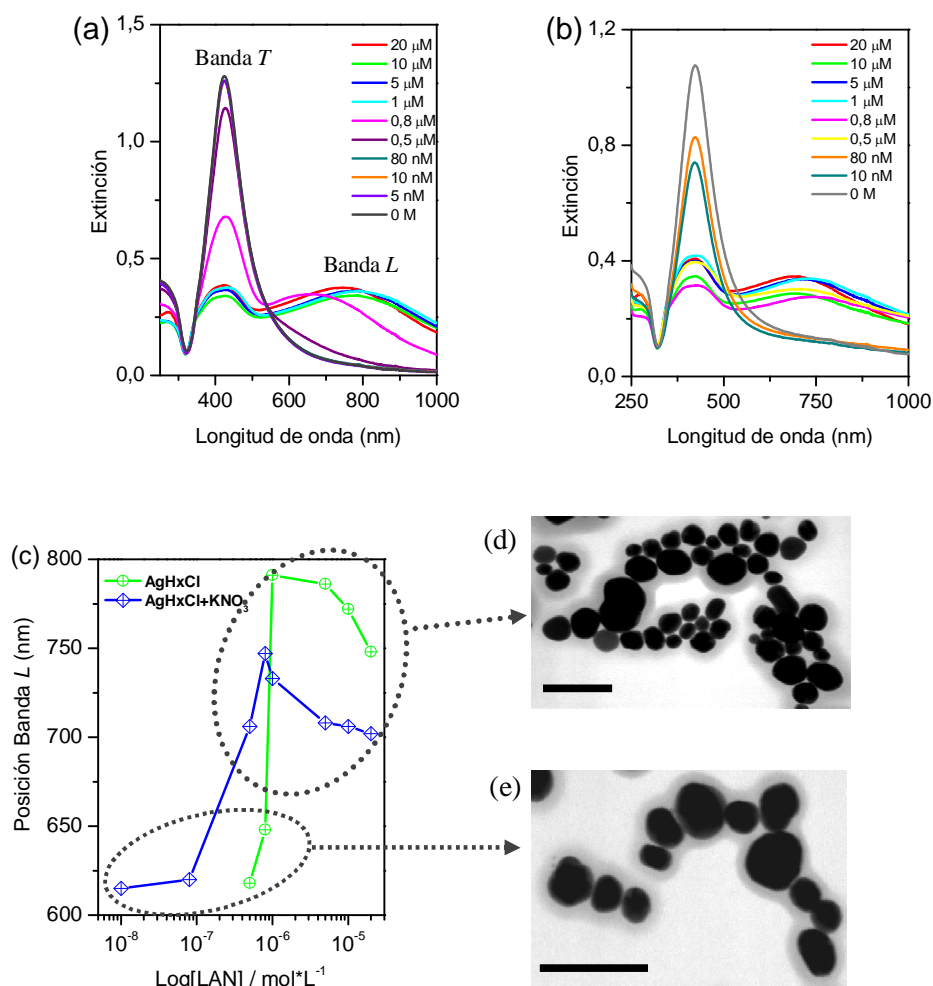


Figura 5.23: Espectros de extinción de la suspensión coloidal AgHxCl en presencia del péptido LAN a diferentes concentraciones: (a) en ausencia, (b) presencia de KNO₃ (0.5 M) y (c) variación de la posición del máximo de resonancia del plasmón a diferentes concentraciones del péptido LAN. Imágenes TEM de los agregados globulares (d) y en cadenas (e) de las NPs de Ag en presencia del péptido LAN a la concentración de 1 μ M. La barra de escala corresponde a 100 nm.

A concentraciones por encima de valores micromolares, el potencial es suficientemente bajo como para permitir la formación de agregados globulares (fig. 5.23d). La aparición de la Banda L hacia longitudes de onda menores. Este comportamiento también explica la existencia de un máximo en el desplazamiento de la banda L alcanzado a una concentración micromolar.

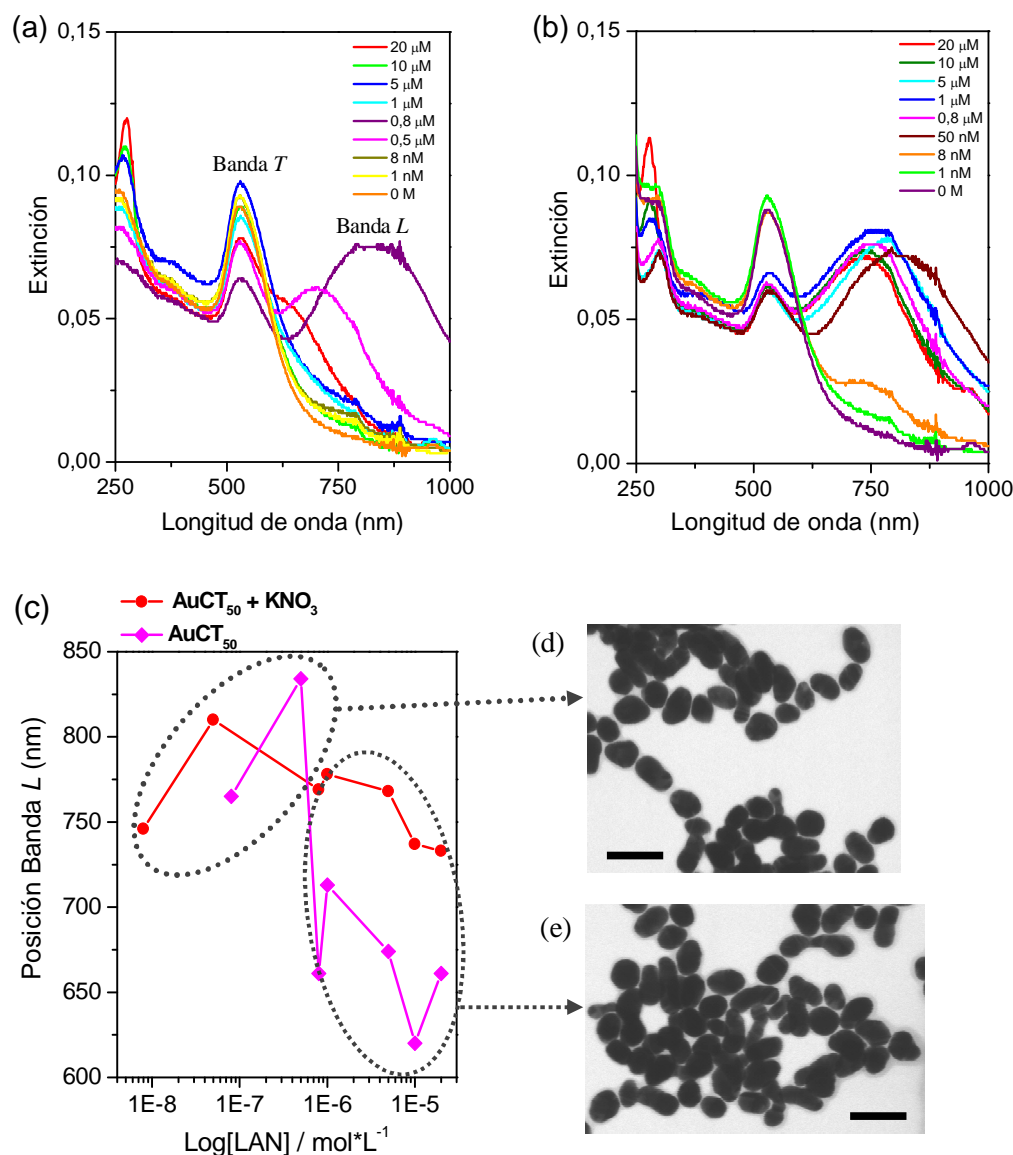


Figura 5.24: Espectros de extinción de la suspensión de AuCT₅₀ en presencia del péptido LAN a diferentes concentraciones: (a) en ausencia, (b) presencia de KNO₃ (0.5 M) y (c) variación de la posición de la Banda *L* a diferentes concentraciones del péptido LAN. Imágenes TEM de los agregados en cadenas (d) y globulares (e) de las NPs de Au en presencia del péptido LAN a una concentración de 1 μM. La barra de escala corresponde a 100 nm.

Otra cuestión a destacar es que si no se agrega el coloide con KNO₃ los desplazamientos de la posición de la banda *L* son más abruptos que si se añade el agente agregante externo. Por otra parte, la adición de nitrato permite bajar la concentración mínima detectable del LAN por la técnica SERS. Lo que se explica en base a un descenso del potencial zeta de las NPs en presencia de la sal, si bien ésta no afecta de manera significativa en el máximo a concentración micromolar. Este efecto

se atribuye a que el nitrato ejerce un efecto salino sin modificar la superficie de adsorción disponible sobre las nanopartículas metálicas.

La adsorción del péptido LAN se estudió también usando NPs esféricas de oro (AuCT₅₀) en presencia y ausencia de KNO₃. El comportamiento del péptido en términos de agregación de las NPs resultó ser muy similar al estudiado con las NPs de Ag. La fig. 5.24 muestra los espectros de extinción de la suspensión coloidal en presencia del péptido a diferentes concentraciones. Asimismo, se muestra la evolución del máximo del plasmón correspondiente a las NPs agregadas por la acción del péptido LAN a distintas concentraciones. Como se vio anteriormente con la plata, para el caso de las NPs de Au se pueden distinguir la presencia de dos tipos de agregados principalmente. Como muestran las micrografías TEM, los agregados globulares (fig. 5.24e) aparecen cuando el péptido se encuentra a altas concentraciones (10^{-5} - 10^{-6} M), mientras que los agregados en forma de cadenas (fig. 5.24d) aparecen mayoritariamente a bajas concentraciones (10^{-7} - 2×10^{-7} M). Este comportamiento obedece también al patrón RLCA-DLCA observado en el caso de Ag.

II. Microscopía Electrónica

La microscopía electrónica de transmisión y de barrido ofreció una información adicional sobre el fenómeno de agregación-adsorción del péptido sobre las NPs metálicas de Ag y Au.

El efecto de agregación observado en las micrografías TEM y SEM de la fig. 5.25 se debe a la presencia únicamente del péptido y su interacción con las NPs de Ag y Au. Tanto en las NPs de Ag como las de Au presentan un diámetro medio de 50 nm. Asimismo, se observa la existencia de una corona alrededor de las nanopartículas de ~7 nm de espesor, debida a la formación de una película de adsorción del péptido sobre las nanopartículas. Por tal motivo, se puede decir, que el poder de agregación del LAN sobre las NPs metálicas es muy parecido independientemente del metal empleado para la adsorción.

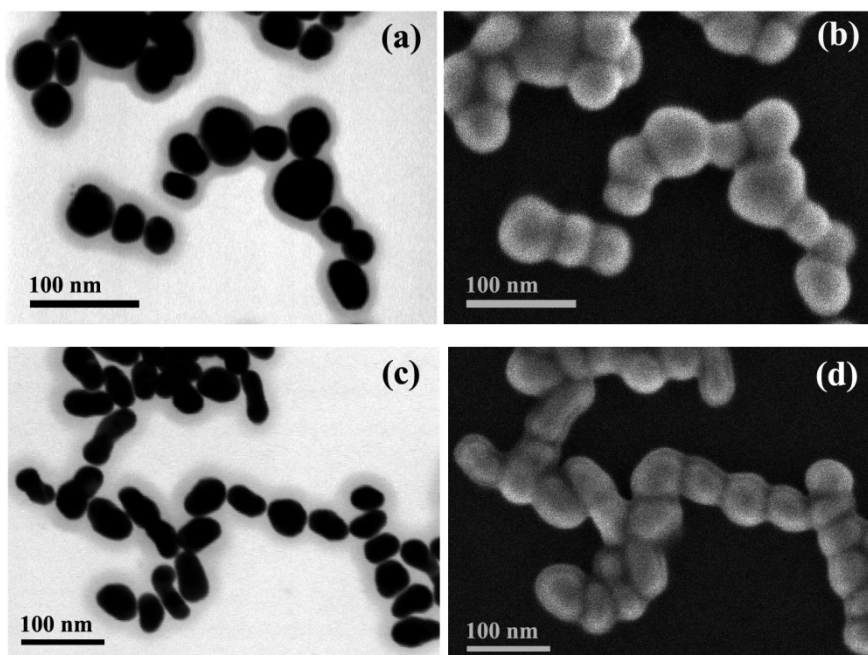


Figura 5.25: Correlación de imágenes TEM (a, c) y SEM (b, d) del péptido LAN (1 μ M) en presencia de coloide de NPs de Ag (a y b) y Au (c y d).

La fig. 5.26 muestra una representación esquemática de la disposición del péptido sobre la superficie de las NPs. La conformación que adquiere una molécula de Lanreótido en disolución acuosa es de β -horquilla que a altas concentraciones (10 % *wt/wt*) forma filamentos autoensamblados, según muestra un trabajo publicado por Valéry y colaboradores [147]. Estos últimos autores observaron que la estructura del filamento estaba compuesta por dos fibras superpuestas de láminas β y cada nanotubo por 26 filamentos. Donde la naturaleza anfifílica del péptido induce la formación de una bicapa en la cual los residuos hidrofóbicos se protegen del agua orientándose hacia el interior, mientras que en el exterior de la fibra de lámina beta se exponen los residuos hidrofílicos. Teniendo en cuenta lo dicho anteriormente, se puede deducir que la corona alrededor de las NPs que forma el péptido está compuesta por más de una capa de LAN. Un comportamiento parecido presenta el péptido de la SST-14 cuando está en presencia de NPs de Ag y Au [232].

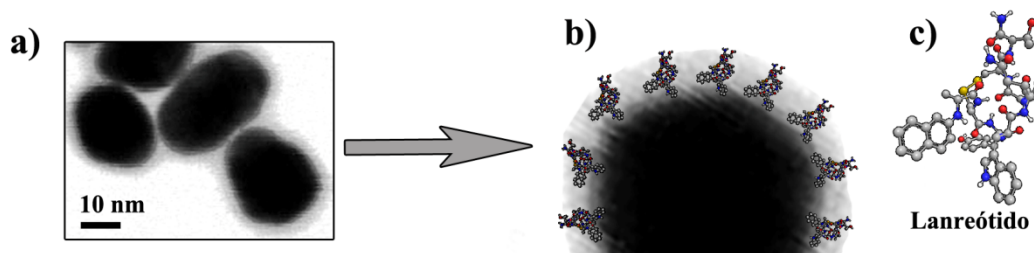


Figura 5.26: (a) Imagen TEM del coloide de AuCT₅₀ en presencia del péptido LAN (1 μ M). (b) Detalle de la imagen TEM-a donde se puede apreciar claramente la corona de péptido (~7 nm de grosor) que rodea a la NP de Au. (c) Estructura del péptido LAN obtenida de la base de datos de *PubChem* [236] y visualizada con el GaussView 5.0 (<http://www.gaussian.com>) [237].

Por otra parte, los estudios realizados por diferentes autores se corresponden con el hecho de que los péptidos pueden modificar la forma de agregación sobre la superficie metálica de las NPs, dando lugar a la formación de fibrillas o agregados tubulares [172, 218, 238]. La concentración del péptido a la que se obtuvieron las imágenes por microscopía electrónica de la fig. 5.25 fue de 1 μ M. En los estudios citados anteriormente las concentraciones empleadas para la fibrilación del péptido fueron muy superiores a las del presente trabajo, siendo del orden de mM, lo cual hace que se puedan observar las estructuras de fibrillas. En las micrografías obtenidas por microscopía electrónica se observa un efecto de ensanchamiento o dilatación de la corona que rodea las NPs debido al calentamiento que se produce en la muestra al ser irradiada con un haz de electrones que poseen una aceleración aproximada de 30 kV [239-241]. Este fenómeno puede influir de manera negativa a la hora de obtener con exactitud el grosor de la corona que forma el péptido alrededor de las NPs metálicas, lo que se aprecia de manera más clara en la imagen (c) de la fig. 5.25 que se corresponde con el péptido LAN en presencia de las NPs de Au. Este efecto podría estar relacionado con la formación de una bicapa de moléculas de LAN sobre la superficie, la cual se expande bajo el efecto de la irradiación con el haz de electrones. El acercamiento del péptido a la superficie provoca un aumento local de la concentración del LAN que daría lugar a una posible fibrilación del mismo. Por otra parte, hemos de considerar que existen dos fuerzas motoras que dirigen la organización del péptido sobre las NPs: a) la adsorción sobre el metal y b) la interacción intermolecular que conduce a la formación de fibrillas. Sin embargo, la ausencia de fibrillas sobre la superficie bien indica que la primera de las fuerzas

motoras es más importante y que el péptido intenta organizarse sobre el metal mediante la formación de una capa de adsorción sobre la nanopartícula.

III. Espectroscópica Raman Intensificada por Superficie

La interpretación de los espectros SERS de los péptidos se llevó a cabo a partir de estudios previos realizados por Hernández y col. [242]. En este estudio se realiza una asignación de las bandas del péptido en estado sólido y en disolución acuosa.

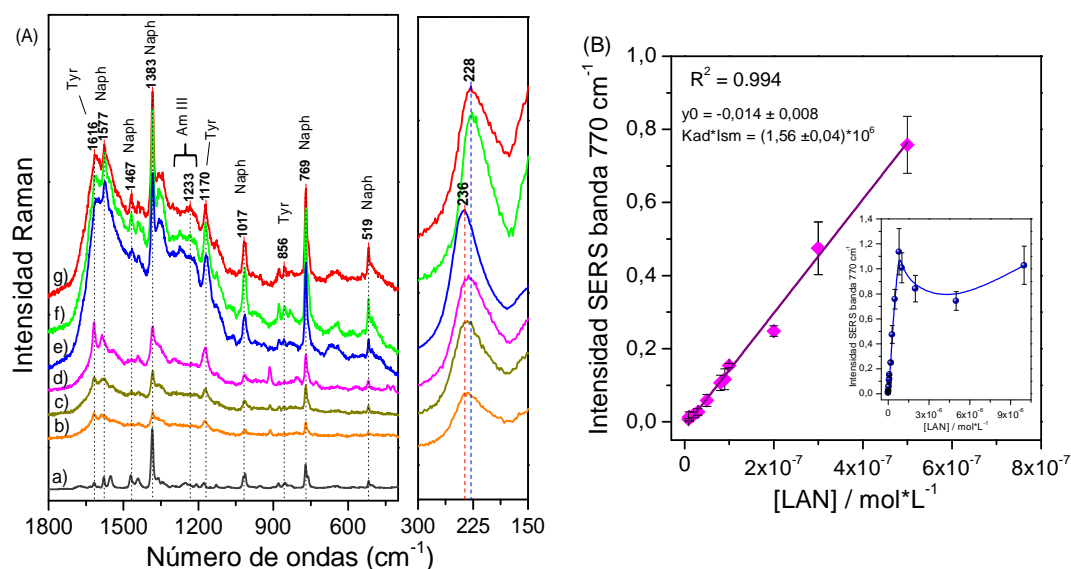


Figura 5.27: (A) Espectro Raman del péptido LAN (20 mM) en disolución acuosa (a) y espectros SERS del Lanreótido sobre AgHxCl agregado con KNO₃ (0.5 M) a diferentes concentraciones: b) 50 nM, c) 80 nM, d) 0.1 μM, e) 0.5 μM, f) 1 μM y g) 5 μM. (B) Recta de calibrado obtenida a partir de la variación de la intensidad de la banda marcadora a 770 cm⁻¹ con la concentración del péptido LAN en AgHxCl en la región 50 nM – 0.5 μM. *Figura Insertada:* Representación global de la variación de la intensidad de la banda marcadora a 770 cm⁻¹ con la concentración del péptido LAN en un intervalo de linealidad situado entre 50 nM y 10 μM. Excitación a 532 nm.

El espectro Raman del péptido LAN (20 mM) en disolución acuosa se muestra en la fig. 5.27Aa. La asignación de las principales bandas se ha realizado en base a los trabajos publicados anteriormente [147, 149, 242, 243]. El carácter aromático del grupo naftil (Naph), que se encuentra en uno de los extremos del péptido hace que las bandas de vibración que aparecen a 1577, 1469, 1370, 1128, 1017, 769 y 519 cm⁻¹, sean las más intensas en el espectro Raman, lo que obviamente se debe al mayor efecto Raman en vibraciones que contienen enlaces π . También se pueden observar algunas bandas correspondientes a los residuos Tyr y Trp pues son los aminoácidos

con carácter aromático, aunque presentan una intensidad relativa menor que las bandas asociadas al naftaleno, debido a su menor aromaticidad. Las bandas que aparecen a las frecuencias de 1617, 1208, 852 y 828 cm^{-1} se atribuyen al residuo Tyr, mientras que las bandas a 1552, 1360, 1344, 1012, 880, y 760 cm^{-1} corresponden al residuo Trp. La vibración asociada al puente disulfuro del péptido $\nu(\text{S-S})$, aparece a la frecuencia de 505 cm^{-1} formando un hombro sobre la banda del naftaleno a 518 cm^{-1} .

Para conocer el mecanismo de interacción de LAN con las NPs de Ag y Au mediante la técnica SERS se realizó un estudio variando la concentración del péptido LAN en presencia de dichas NPs metálicas agregadas con KNO_3 . Por otra parte, se llevó a cabo un análisis cuantitativo a partir de las señales SERS, análogo al realizado para los colorantes histológicos de la sección 5.2, basado en el análisis de la variación de la intensidad de una banda marcadora a diferente concentración con el fin de determinar los parámetros analíticos: límite de detección y recta de calibrado para la cual existe una variación lineal entre la concentración de LAN y la intensidad SERS.

El estudio SERS del péptido LAN utilizando los substratos de NPs esféricas metálicas de Ag y Au permitió deducir un posible mecanismo de interacción del péptido con la superficie del metal cuando se analizan los cambios espectrales respecto al espectro en disolución. La fig. 5.27A, muestra los espectros SERS (b-g) del péptido a diferentes concentraciones sobre NPs de Ag. El panel de la derecha en la fig. 5.27A muestra la región correspondiente a bajos número de ondas (300 - 150 cm^{-1}) que señala con más detalle la banda de tensión metal-cloruro ($\nu(\text{Ag-Cl})$).

Todos los espectros SERS mostrados en la fig. 5.27A están normalizados respecto a la banda del agua correspondiente a 3400 cm^{-1} . Asimismo, estos espectros son el resultado de restar el espectro del blanco (coloide con KNO_3). Las bandas que se ven más intensificadas de manera relativa en el espectro SERS a altas concentraciones (5 a 0.5 μM) son las correspondientes principalmente al grupo Naph, mientras que a bajas concentraciones (100 a 50 nM) las bandas debidas a los residuos de Tyr y Trp están más intensificadas. Tal como se explicó en el *Capítulo 2*, la intensificación de un grupo químico determinado indica su posición relativa respecto a la superficie debido al efecto de corto alcance en SERS. La relación entre las bandas que aparecen a 1616 y 1570 cm^{-1} que se pueden relacionar con la Tyr y el Naph respectivamente. A altas concentraciones del péptido LAN (5 μM), fig. 5.27Ag, la relación de intensidades correspondientes al doblete de bandas a 1616/1570 ($I_{\text{T/N}}$) puede tomarse como una

medida de la intensificación relativa de la Tyr y el Naph respectivamente relacionada a su vez con la distancia a la superficie. Estructuralmente hablando es interesante un análisis de la región del espectro asociada a la amida III ($1300\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$), ya que esta banda muestra en detalle la estructura secundaria del péptido. En esta región se observa una banda a 1233 cm^{-1} que se puede asociar con la estructura en láminas β . Esta banda se observa más intensa en los espectros SERS a altas concentraciones (fig. 5.27A (e, f y g)).

En estudios anteriores llevados a cabo por nuestro grupo se ha visto que los péptidos tienden a interaccionar con la superficie de Ag a través de grupos catiónicos, concretamente grupos amino protonados ($-\text{NH}_3^+$), que forman pares iónicos con los iones Cl^- residuales que quedan adsorbidos tras la fabricación de las NPs de Ag [234, 244]. En el péptido LAN existen dos posibles puntos de interacción con la superficie del metal correspondientes al grupo amino que se encuentra cercano al grupo Naph y el grupo amino de la cadena lateral de la Lys. La intensificación relativa de bandas de Naph a bajas concentraciones sugiere un acercamiento del péptido a la superficie a través del amino adyacente al Naph, mientras que el fortalecimiento de bandas del residuo de Tyr a mayores concentraciones indica un mayor protagonismo del residuo Lys en la interacción con la superficie.

Esta diferente orientación de LAN sobre la superficie metálica a distintos recubrimientos de la superficie parece estar relacionada con un posible cambio estructural del péptido sobre la superficie. El mayor acercamiento del péptido a través del grupo Naph a altas concentraciones posiblemente facilita la formación de las estructuras de láminas beta ya que los aminoácidos cargados (Lys) y aromáticos (Tyr y Trp) estarían más libres para la formación de estas estructuras laminares y la interacción intermolecular se vea favorecida [147, 245].

La región de bajas frecuencias ($300 - 150\text{ cm}^{-1}$) aporta información adicional acerca del mecanismo de adsorción de LAN sobre Ag, ya que el enlace Ag-Cl^- se ve fuertemente modificado por la formación de pares iónicos entre el anión cloruro y los posible cationes que interaccionan con él. Normalmente la formación del par iónico tiene como resultado un desplazamiento de esta banda hacia menores frecuencias debido a un consiguiente debilitamiento del enlace Ag-Cl . La fig. 5.27A derecha muestra un claro desplazamiento de la banda $\nu(\text{Ag-Cl}^-)$ desde 236 hasta 228 cm^{-1} , lo que está relacionado con el cambio en el anclaje del péptido sobre la superficie.

La fig. 5.27B muestra la recta de calibrado que describe la variación entre la intensidad de la banda marcadora a 770 cm^{-1} asociada al grupo Naph frente al cambio de la concentración del péptido. La zona de linealidad que presenta este péptido es amplia (1×10^{-8} hasta $5 \times 10^{-7}\text{ M}$) con un valor de la pendiente de valor $(1.56 \pm 0.04) \times 10^6$, lo que representa una alta sensibilidad de la molécula por la detección SERS. La variación de la intensidad de la banda a 770 cm^{-1} con la variación de la concentración de LAN en todo el intervalo de concentraciones estudiado (fig. 5.27B, gráfico insertado) indica que LAN no sigue un comportamiento tipo Langmuir. Este resultado se atribuye a los complejos cambios estructurales y de anclaje que el péptido LAN experimenta sobre la superficie de Ag con intervención de posibles interacciones intermoleculares.

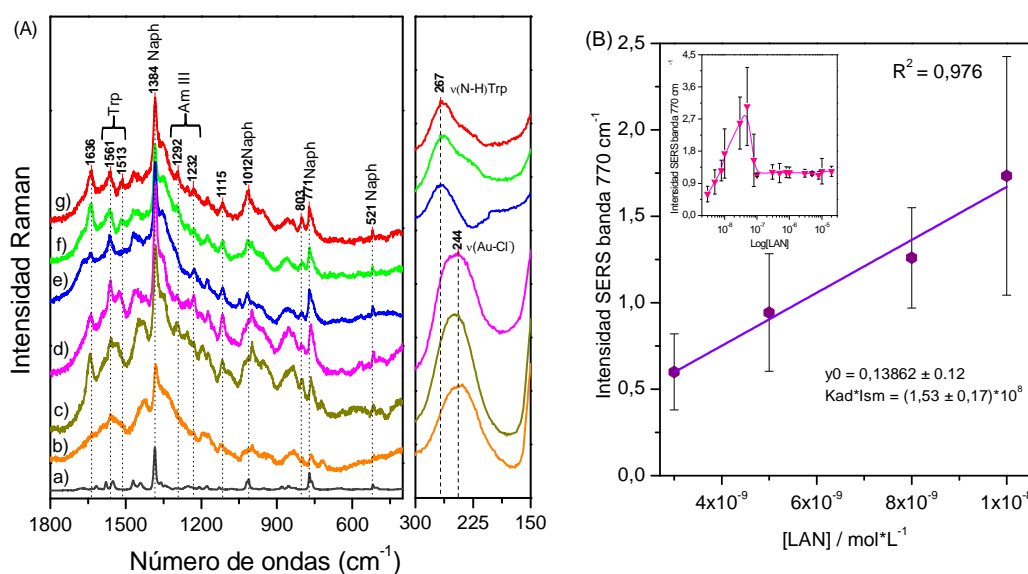


Figura 5.28: (A) Espectro Raman del péptido LAN (20 mM) en disolución acuosa (a) y espectros SERS del Lanreótido sobre AuCT_{50} agregado con KNO_3 (0.5 M) a diferentes concentraciones: b) 3 nM, c) 8 nM, d) 50 nM, e) 0.5 μM , f) 3 μM y g) 8 μM . (B) Recta de calibrado obtenida a partir de la variación de la intensidad de la banda marcadora a 770 cm^{-1} con la concentración del péptido LAN en AuCT_{50} en la región 5 – 10 nM. *Figura Insertada:* Representación global de la variación de la intensidad de la banda marcadora a 770 cm^{-1} con la concentración del péptido LAN en un intervalo entre 1 nM y 100 μM . Excitación a 785 nm.

Los espectros SERS del LAN en presencia de nanopartículas de AuCT_{50} se muestran en la fig. 5.28A. Tal y como ocurre para el caso de Ag, el péptido presenta mecanismos de unión a la superficie metálica en dependencia de las condiciones experimentales a la que se trabaje. Los péptidos cambian su mecanismo de interacción sobre Au respecto a Ag, tal como se ha visto en trabajos anteriores realizados con la

somatostatina [232], de tal forma que el residuo de Trp presenta una mayor afinidad por la superficie. Las bandas de este residuo aparecen sobre Au a 760 cm^{-1} (hombro de la banda de Naph a 771 cm^{-1}), 1115 , 1360 , 1513 y 1561 cm^{-1} . Las dos últimas bandas se asocian al Trp cuando se encuentra interaccionando con la superficie de Au (1561 cm^{-1}) o libre (a 1513 cm^{-1}). A altas concentraciones de LAN coexisten ambas bandas, por lo que se deduce que existen moléculas de péptido interaccionando con la superficie a través del residuo de Trp y otras que no lo hacen a través de este residuo. Sin embargo, a bajas concentraciones ($50 - 3\text{ nM}$) prevalece el Trp libre, mientras que las bandas del grupo Naph se intensifican relativamente con respecto al resto de bandas del espectro.

El análisis de la banda $\nu(\text{Au-Cl})$ (fig. 5.28A, derecha) sugiere también que el péptido presenta dos posibles sitios de interacción con la superficie metálica. A concentraciones de LAN por encima de $0,5\text{ }\mu\text{M}$ aparece una banda a 267 cm^{-1} relacionada con la interacción del residuo de Trp con Au, mientras a concentraciones por debajo de dicho valor se observa la banda $\nu(\text{Au-Cl})$ a 244 cm^{-1} [232]. El tipo de información que se derivada de este análisis apoya la idea anteriormente planteada de la posible interacción del péptido con la superficie de las NPs por dos sitios diferentes, el grupo Naph y el residuo de Trp, siendo la interacción con Trp más importante a altas concentraciones.

La región de linealidad para la relación de la variación de la intensidad de la banda marcadora a 770 cm^{-1} que pertenece al grupo Naph a diferentes concentraciones de LAN sobre el coloide de AuCT₅₀ se muestra en el gráfico de la fig. 5.28B. Esta zona de linealidad para el péptido sobre las NPs de Au es muy limitada (de 3×10^{-9} a $1 \times 10^{-8}\text{ M}$). No obstante el valor de la pendiente obtenida mediante el ajuste es muy elevado $(1.53 \pm 0.17) \times 10^8$, lo cual significa que frente a las NPs de Au, el péptido de LAN presenta una alta sensibilidad cuando se usa la técnica SERS. Aún así, hay que remarcar que el Lanreótido no describe un comportamiento del tipo Langmuir en la adsorción sobre la superficie, ver gráfico insertado en la fig. 5.28B. Este efecto puede estar relacionado con el complejo mecanismo de adsorción que presenta esta molécula sobre la superficie metálica. Pues en el proceso de formación de agregados en multicapas sobre las NPs metálicas predominan dos formas de interacción: las intermoleculares y las moléculas – NP, y en dependencia del tipo de interacción que

prime en el sistema, será el tipo de agregado que se forme (fibrillas, nanotubos y/o filamentos) [218].

5.3.2 Análisis de la adsorción del péptido Pasireótido (SOM230) sobre nanopartículas plasmónicas

El péptido SOM230 ha sido menos investigado que los péptidos de estructura similar LAN y SST-14. Por lo tanto, se ha prestado una especial atención al estudio de la adsorción de SOM230 sobre nanopartículas plasmónicas de Ag y Au.

I. Espectros de extinción

Los resultados obtenidos mediante espectrofotometría UV-visible en presencia de NPs metálicas de Ag y Au, muestran que el SOM-230 al igual que el LAN ejerce un efecto agregante sobre los coloides de Ag (fig. 5.29a) y Au (fig. 5.30).

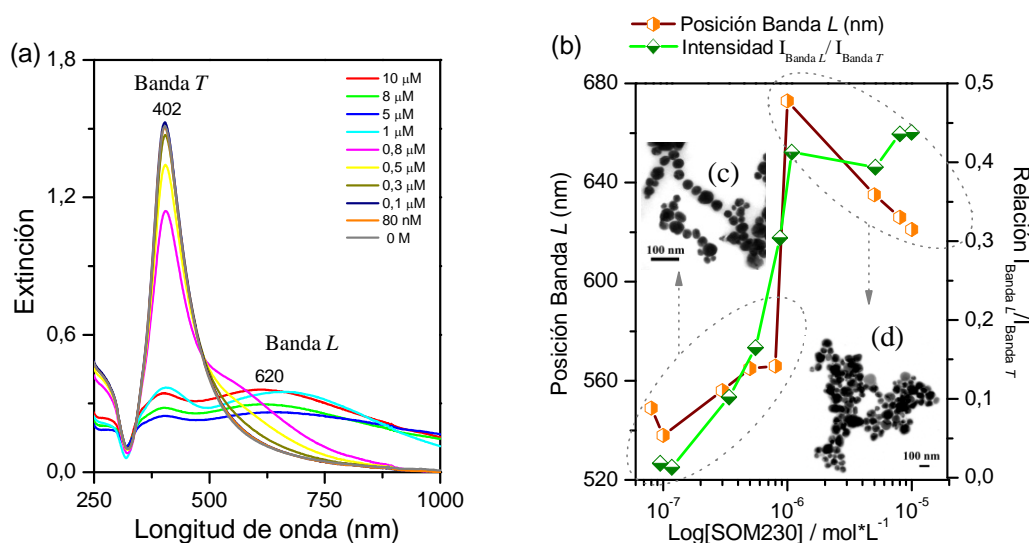


Figura 5.29: Espectros de extinción del péptido SOM230 a diferentes concentraciones sobre coloide AgHxCl y activado con KNO₃ (0.5 M) (a). Variación de la posición e intensidad de la Banda L de los agregados con el cambio de la concentración del péptido SOM230 (b). Imágenes TEM correspondiente a los agregados lineales (c) y globulares (d) que se forman por la interacción del péptido con las NPs de Ag a concentración 1 μM.

Si se analiza la banda de extinción *L* que se encuentra alrededor de los 620 nm (fig. 5.29a) con la variación de la concentración del péptido se observa que a una determinada concentración de SOM230 ($\sim 10^{-6}$ M) ocurre un fuerte cambio en las

intensidades relativas. Este efecto puede estar relacionado con la facilidad que presenta la molécula SOM230 de inducir diferentes tipos de agregados en las NPs en dependencia de la concentración a la que se encuentre en disolución. Los estudios realizados por microscopía electrónica (TEM) sugieren un efecto de agregación, como se muestra en las imágenes (c) y (d) de la fig. 5.29. A altas concentraciones del péptido SOM230 ($\sim 10^{-5}$ a 10^{-6} M) se forman agregados del tipo globular mayoritariamente, mientras que a concentraciones más bajas ($\sim 5 \times 10^{-7}$ a 10^{-8} M) la tendencia del péptido es a formar agregados en forma de largas cadenas compuestas hasta por 8 – 10 NPs de plata. La fig. 5.29b también muestra la variación de la posición del máximo de la Banda *L* con la concentración de la molécula. El comportamiento que describe esta medida es un reflejo de lo complejo que es el mecanismo de adsorción que experimenta el péptido en presencia de las NPs metálicas. Al variar la concentración del SOM230 se produce una neutralización de cargas entre el coloide AgHxCl y el péptido SOM230, permitiendo así la existencia de diferentes tipos de agregados, los cuales varían según los patrones RLCA-DLCA, tal y como ocurre también para el péptido LAN.

El péptido SOM230 presenta un comportamiento diferente al observado en NPs de Ag cuando interacciona con NPs de Au. En la fig. 5.30 se recogen los espectros de extinción del coloide de AuCT₅₀ cuando se pone en contacto con el SOM230 a diferentes concentraciones. Este efecto característico que describen los espectros de extinción de las NPs de Au cuando se encuentran en presencia de adsorbatos consiste en el desplazamiento batocrómico a bajas concentraciones de la banda de agregados *L* seguido de un desplazamiento hipsocrómico a longitudes de onda cercanas a la del plasmón de la NP de Au, el cual ha sido estudiado con anterioridad por otros grupos de investigación incluido el nuestro [232, 246, 247].

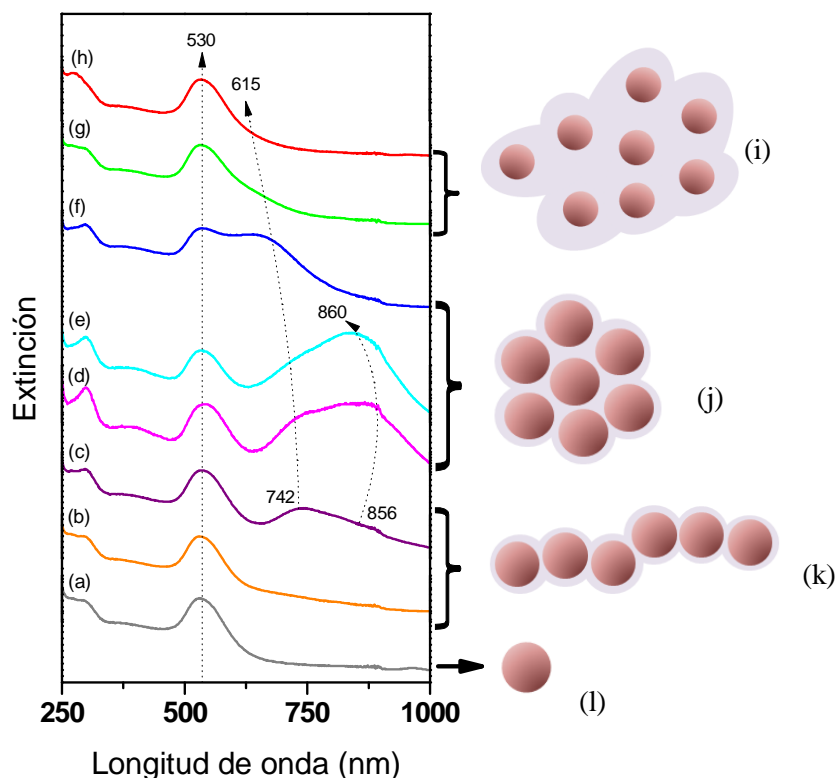


Figura 5.30: *Izquierda:* Espectros de extinción de las NP AuCT₅₀ activados con KNO₃ (0.5 M) (a) y en presencia del péptido SOM230 a diferentes concentraciones: 10 nM (b), 30 nM (c), 80 nM (d), 0.1 μ M (e), 0.3 μ M (f), 8 μ M (g) y 10 μ M (h). *Derecha:* Esquema representativo de los tipos de agregados que se forman por la interacción de las NPs de Au con el péptido SOM230 a diferentes concentraciones: desacoplamiento plasmónico (i), globulares (j), lineales (k) y una NP de Au individual (l).

La interacción entre el péptido y las NP está controlada principalmente por dos factores; i) la transición de modelos de agregación RLCA-DLCA al variar la concentración y ii) por la formación de una corona alrededor de las NPs que puede influir en la agregación de las NPs. Ambos efectos pueden afectar al perfil espectral de extinción del complejo péptido-NP. Cuando la molécula se encuentra a una concentración de 30 nM (fig. 5.30c) aparece un máximo de extinción a 742 con un pequeño hombro a 856 nm, el cual se intensifica al subir la concentración hasta 0.3 μ M. Estas extinciones están asociadas a la formación de agregados lineales cuya longitud de cadena aumenta con la concentración de péptido, lo que explica el desplazamiento de la resonancia *L* hacia mayores longitudes de onda. El aumento de concentración hasta 0,3 μ M, da lugar a un fuerte desplazamiento de la banda *L* hasta menores valores de longitud de onda (615 nm) correspondiente a la formación de agregados globulares como se muestran en el esquema de la fig. 5.30j. En estas

condiciones la carga negativa que presentan las NPs de Au están contrarrestadas en gran medida por las moléculas de SOM230 que presentan una carga neta positiva (+2) debido a los grupos NH_2 existentes en la cadena lateral del residuo de Lys y del grupo amino terminal del residuo 7 (fig. 5.22b). Este efecto induce una agregación del tipo DLCA que conduce a una agregación más desordenada y unas agrupaciones de NPs con forma globular. A concentraciones más altas ($> 0,3 \mu\text{M}$) se produce un desacoplamiento entre NPs que da lugar a la práctica desaparición de la banda L debido a que las NPs se sitúan a una distancia demasiado larga (fig. 5.30i).

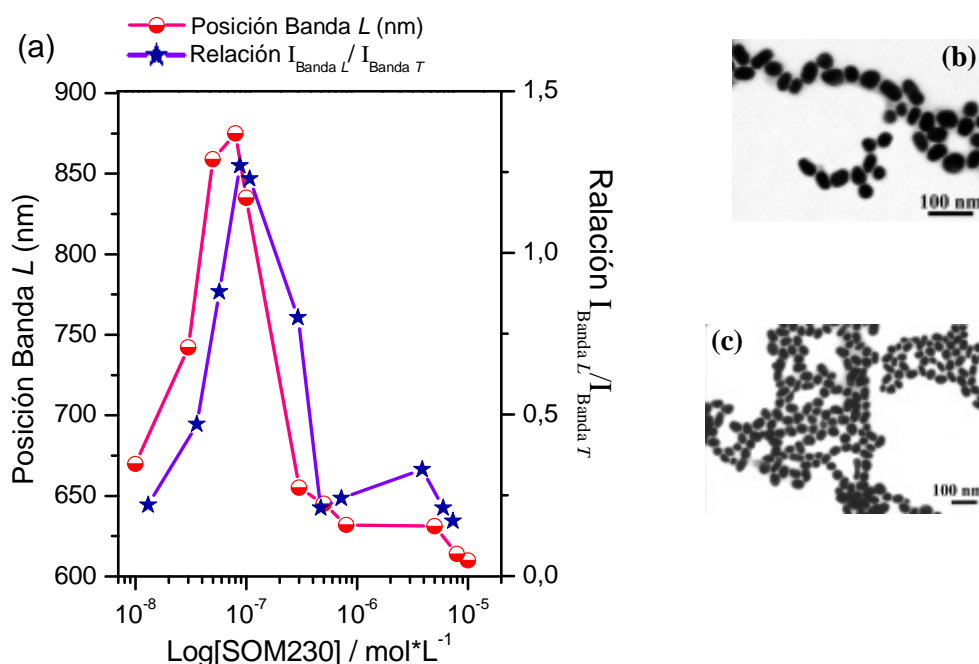


Figura 5.31: Variación de la posición y la relación de intensidades del máximo de la Banda L de los agregados con el cambio de la concentración del SOM230 (a). Imágenes TEM de los agregados lineales (b) y globulares (c) que se forman por la interacción de las NPs de Au con el péptido a concentración $1 \mu\text{M}$.

El gráfico de la fig. 5.31 relaciona la posición del máximo de extinción y la relación de las intensidades relativas de los máximos de extinción de las Bandas L y T al variar la concentración del péptido. La posición del máximo de extinción para los agregados al variar la concentración del péptido sufre cambios significativos en su posición, desplazándose hasta ~ 250 nm. Este comportamiento indica que el péptido SOM230 forma distintos tipos de agregados al interaccionar con las nanopartículas de oro en el coloide de AuCT_{50} , tal como se explicó en el párrafo anterior. Como se verá más adelante, las diferencias entre los espectros de extinción de los agregados de SOM230

en presencia de las NPs de Ag (fig. 5.29a) con respecto a las variaciones observadas en la Banda *L* de SOM230 en NPs de Au están relacionadas con los diferentes mecanismos de adsorción del péptido sobre las superficies de estos metales.

II. Microscopía Electrónica de Transmisión

Las imágenes obtenidas por microscopía electrónica TEM permiten observar la formación de una corona peptídica que rodea a las NPs tanto de Ag como de Au. Para el caso del SOM230 solo se obtuvieron imágenes por TEM mientras que para LAN se utilizó tanto TEM como SEM, ver fig. 5.32. Se decidió tomar solo imágenes por microscopía electrónica de transmisión porque el contraste ofrecido por esta técnica es mayor que con para técnica de SEM, además de que se observó que la materia orgánica que conforma el péptido se modifica al entrar en contacto con el haz de electrones proveniente de la fuente de irradiación del microscopio. Este efecto se observó con anterioridad para el péptido LAN (sección 5.3.1).

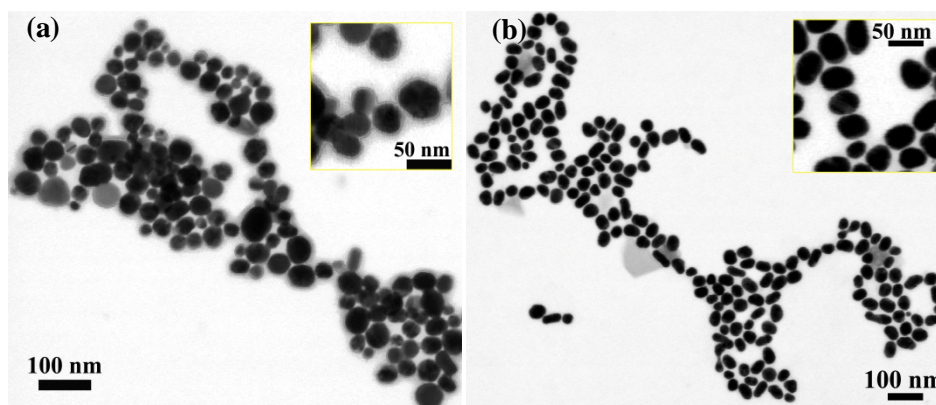


Figura 5.32: Imágenes TEM de NPs plasmónicas agregadas en presencia del péptido SOM230 (1 μ M) y activadas con KNO_3 (0.5 M): AgHxCl (a) y AuCT₅₀ (b).

Las imágenes TEM de las NPs plasmónicas agregadas mediante SOM230 se muestran en la fig. 5.32. Al igual que en el caso del péptido LAN, la microscopía electrónica aportó información crucial para entender los mecanismos de agregación a diferente concentración, tal como se mostró en la fig. 5.25. Esta información sirvió para explicar cambios observados en los espectros de resonancia de plasmón de dichas figuras. Por otra parte, la adsorción del péptido sobre las NPs metálicas puede visualizarse en las imágenes TEM (fig. 5.32a) donde puede apreciarse la formación de una corona de naturaleza peptídica alrededor de las nanopartículas.

El grosor de la corona orgánica que forma el péptido es de 6 ± 1 nm. Sin embargo, cuando el SOM230 se encuentra en presencia de NPs de oro, como muestra la fig. 5.32b, la corona formada por el péptido alrededor de la nanopartícula es algo más fina (5 ± 1 nm) y con menor densidad óptica en relación con la que se forma alrededor de la NPs de Ag. Además, en el caso del Au las NPs se disponen de una forma más ordenada formando cadenas reticulares, con espacios vacíos entre las mismas. La distancia promedio entre las partículas de Au es de 3 ± 1 nm, mientras que para el caso de las NPs de Ag se encuentran a una distancia de separación entre ellas casi imperceptible en la imagen TEM en la mayoría de las nanopartículas, por lo que no se indica ese valor para las NPs de Ag. Las diferencias observadas al variar el metal se atribuyen a la distinta organización del péptido sobre cada uno de los metales, lo que redundaría en la formación de capas de adsorción con una estructura probablemente distinta.

En la tabla 5.5 se resumen los valores medios medidos para el diámetro de las NPs de Ag y Au así como la desviación estándar de estos valores. También se muestran los valores del grosor de la corona formada por los péptidos LAN y SOM230 alrededor de las NPs, obtenidos a partir del análisis de las imágenes TEM.

Tabla 5.5: Valores medios del diámetro (d) junto con su desviación estándar (σ) del tamaño de las nanopartículas de Ag y Au, así como de la corona peptídica (s) formada por los péptidos Lanreótido y Pasireótido alrededor de las NPs como consecuencia de su adsorción. El número de muestra analizado fue $n = 80$.

Péptido LAN	NPs Ag (nm)	NPs Au (nm)
Diámetro de la NP ($d \pm \sigma$)	50 ± 10	50 ± 6
Grosor de la corona ($s \pm \sigma$)	7 ± 2	8 ± 1
Péptido SOM230	NPs Ag (nm)	NPs Au (nm)
Diámetro de la NP ($d \pm \sigma$)	50 ± 10	50 ± 6
Grosor de la corona ($s \pm \sigma$)	6 ± 1	5 ± 1

Del análisis de los valores mostrados en la tabla 5.4 se puede concluir que el péptido LAN da lugar a la formación de una corona peptídica sobre la superficie metálica de mayor grosor que la formada por el péptido SOM230 en las mismas condiciones. Este comportamiento puede estar relacionado con las diferentes formas

estructurales que presentan ambos péptidos y la distinta composición y secuencia de los aminoácidos que lo componen.

La estructura del LAN presenta una mayor flexibilidad debido a la forma de horquilla que le proporciona la unión debida al puente disulfuro formado por los dos residuos de cisteína (Cys²-Cys⁷) que componen la estructura del péptido (fig. 5.22a). Mientras que el péptido SOM230 posee una estructura secundaria más cerrada y menos flexible, debido a la existencia de seis enlaces peptídicos que dan lugar a una estructura en forma de anillo, de mayor rigidez que en el caso del LAN. Por lo tanto es de esperar que los agregados que forman ambas moléculas sean diferentes.

III. Espectroscopía Raman Intensificada por Superficie

Los espectros SERS del péptido SOM230 obtenidos utilizando coloides de AgHxCl y AuCT₅₀ como substratos SERS, se muestran en la fig. 5.33. Los espectros SERS de este péptido se registraron usando líneas de excitación a 532 nm, para los experimentos con NPs de Ag, y a 785 nm para las medidas con NPs de Au, ya que estas líneas láser se adecuaban mejor a las condiciones de excitación de la banda *L* correspondiente al SOM230. Asimismo, para este último péptido se llevó a cabo la activación previa del coloide mediante agregación del mismo por adición de nitrato potásico con el objetivo de bajar el límite de detección del péptido.

Como se puede ver en la fig. 5.33A, a medida que aumenta la concentración del péptido en presencia de las NPs de Ag (espectros (i) al (a)), la intensidad SERS de los espectros aumenta hasta una concentración de 1 μ M, a partir de la cual la intensidad desciende notablemente y se produce un cambio significativo del perfil del espectro. La variación de la intensidad se analizará más adelante en más detalle. El cambio paralelo que ocurre tanto en intensidad absoluta como relativa de los espectros se explica en base a una repentina modificación del patrón de adsorción del péptido sobre la superficie, y posiblemente de su propia estructura molecular, que tiene evidentes consecuencias sobre la agregación de las NPs.

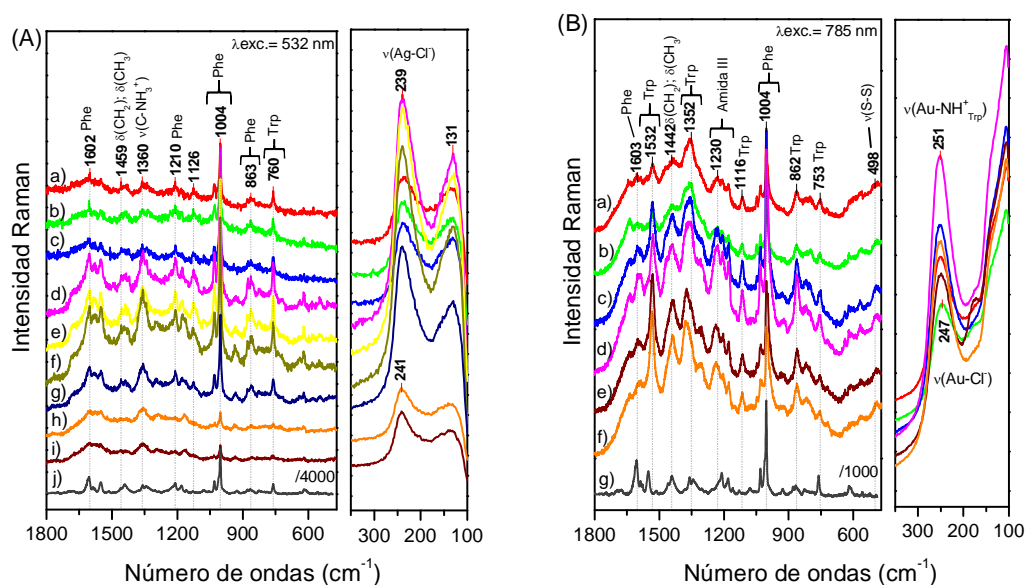


Figura 5.33: Espectros SERS del péptido SOM230 sobre NPs de Ag (A) y Au (B). Las NPs de plata corresponden al coloide AgHxCl activado con KNO_3 (0.5 M) a diferentes concentraciones de SOM230; a) 10 μM , b) 8 μM , c) 5 μM , d) 1 μM , e) 0.8 μM , f) 0.5 μM , g) 0.3 μM , h) 0.1 μM , i) 80 nM y j) espectro Raman de SOM230 en disolución acuosa 2.5 mM (láser 532 nm). Las NPs de Au corresponden al coloide AuCT₅₀ activado con KNO_3 (0.5 M) a diferentes concentraciones de SOM230; a) 0.3 μM , b) 0.1 μM , c) 80 nM, d) 50 nM, e) 30 nM, f) 10 nM y g) espectro Raman de SOM230 en disolución acuosa 2.5 mM (láser de 785 nm). Los espectros están normalizados a la banda 3400 cm^{-1} del agua.

El espectro SERS a concentraciones por debajo de 1 μM presenta bandas intensas de grupos aromáticos, concretamente las bandas que aparecen en la región $1540\text{--}1620\text{ cm}^{-1}$. Estos grupos aromáticos serían los correspondientes al residuo Trp y al residuo éter en posición 2. Asimismo, la intensificación de bandas correspondientes al residuo Trp (1550 , 1360 , 760 cm^{-1}) y la presencia de una banda de intensidad media a 1175 cm^{-1} , asociada a vibraciones del grupo amino del residuo Lys, sugiere la interacción del péptido SOM230 a través de la Lys mediante una interacción electrostática resultante de la formación del par iónico entre el grupo NH_2 y los iones cloruro existentes sobre la superficie del metal en coloides AgHxCl. La preponderancia de la banda a 1360 cm^{-1} de Trp se puede atribuir a la exposición del grupo indólico de este aminoácido a un medio más hidrofílico del grupo indólico [248], tal como cabría esperar de la proximidad de este residuo a la superficie cargada con iones cloruro. A concentraciones por encima de 1 μM , las bandas correspondientes a los grupos aromáticos éter junto con las del residuo Trp experimentan un notable debilitamiento en relación a la banda de Phe. Este cambio puede estar asociado a un cambio en el

punto de anclaje del péptido respecto al metal, que ahora interaccionaría mediante el grupo amino en la posición 7.

La fig. 5.33B, muestra los espectros SERS utilizando coloide de AuCT₅₀ como sustrato. La relación señal/ruido de estos espectros resulta ser mayor que para el caso de los SERS sobre NPs de Ag. Sobre Au el residuo de Trp cobra un notable protagonismo por sufrir una intensificación las bandas de este residuo, así como un desplazamiento, efecto éste paralelo al observado en el caso de lanreótido. Concretamente, las bandas de Trp aparecen a 1532, 1361, 1116 y 753 cm⁻¹. La banda de Trp que aparece en el espectro Raman de la disolución a 1550 cm⁻¹ (fig. 5.33Bg) se asigna a vibraciones de tensión del anillo indólico y experimenta un fuerte desplazamiento hacia un menor número de ondas debida a la interacción del grupo NH indólico con el metal [232]. La interacción de la molécula a través del residuo de Trp con la superficie de Au se puede confirmar también mediante varios hechos que se describen a continuación, i) el incremento que sufre la banda a 1116 cm⁻¹ que está relacionado con el movimiento de flexión angular localizado alrededor del átomo de N_ε del anillo indol del Trp [249], ii) el desplazamiento hacia menor número de ondas de las bandas del Trp desde 880 hasta 862 cm⁻¹ y 760 hasta 753 cm⁻¹ y iii) el cambio observado en el doblete característico del Trp del espectro Raman en disolución a 1362 y 1342 cm⁻¹ (fig. 5.31Bg). Estas dos últimas bandas se fusionan en los espectros SERS a altas concentraciones (5×10⁻⁷- 8×10⁻⁸ M) y aparece una nueva banda a 1357 cm⁻¹, que está relacionada con el Trp ligado a la superficie metálica. Sin embargo, a bajas concentraciones de SOM260 (5×10⁻⁸ - 5×10⁻⁹ M) se puede observar que la banda a 1362 cm⁻¹ se restablece en el perfil espectral lo que sugiere que el Trp se encuentra libre y no está implicado en la interacción con la superficie [232]. Este resultado es de notable importancia para las aplicaciones de estos péptidos (LAN y SOM230) en procesos de funcionalización de nanopartículas donde el punto de unión del péptido con el blanco celular (en este caso la secuencia de aminoácidos Trp-Lys-Thr) tenga que permanecer libre para posibles aplicaciones teranósticas.

El péptido SOM230 presenta un mecanismo de interacción con las NPs de Ag y Au de características complejas, donde las interacciones entre moléculas del péptido y molécula-NPs juegan un importante papel debido a la capacidad de esta familia de péptido para formar fibrillas y macro-agregados peptídicos, como también influye en la agregación de las propias NPs plasmónicas. La presencia de las NPs puede

potenciar la formación de diferentes tipos de agregados y permite el estudio de estos sistemas a bajas concentraciones.

IV. *Análisis cuantitativo del péptido sobre la superficie metálica*

El estudio de la variación de la concentración del SOM230 y su adsorción sobre la superficie metálica se realizó empleando como banda marcadora la banda de Phe que aparece a 1004 cm^{-1} (I_{Phe}) en los espectros SERS. La variación de la intensidad SERS normalizada de esta banda medida sobre AgHxCl y AuCT₅₀ con respecto a la banda a 3400 cm^{-1} del agua se muestra en la fig. 5.34. Esta banda se tomó como banda marcadora ya que no interviene en la formación del complejo NP-molécula y no cambia ni su posición ni la amplitud de la banda a lo largo del estudio.

La fig. 5.34a muestra la variación de I_{Phe} medida en la zona de bajas concentraciones del péptido ($10^{-8} - 5 \times 10^{-7}\text{ M}$) en presencia de AgHxCl, en donde se aprecia un comportamiento lineal de I_{Phe} frente a [SOM230]. El gráfico (b) de la fig. 5.34 muestra la relación de la banda marcadora a 1004 cm^{-1} con la variación de la concentración en todo el rango de concentraciones estudiado ($10^{-8} - 10^{-5}\text{ M}$). Como se puede observar, la forma de la curva mostrada posee una forma sigmoideal, lo que evidencia una vez más la complejidad de la interacción entre el péptido y la superficie metálica. Aunque hay que resaltar que a bajas concentraciones el péptido describe un comportamiento lineal con una elevada sensibilidad para la técnica SERS. La evolución sigmoideal de $I_{\text{Phe}}/[\text{SOM230}]$ por debajo de la concentración umbral $1\text{ }\mu\text{M}$ revela que la adsorción del péptido puede estar influida por dos efectos que la alejan del comportamiento tipo Langmuir: a) el efecto ensamblador de varias NPs por parte del péptido conducente a la formación de espacios interpartícula donde la intensificación SERS es mucho mayor; y b) formación de multicapas del péptido sobre la superficie metálica. Evidentemente, estos comportamientos complejos se deben a la existencia de varios puntos de interacción en la estructura del SOM230, tal como se deduce del análisis de los espectros SERS.

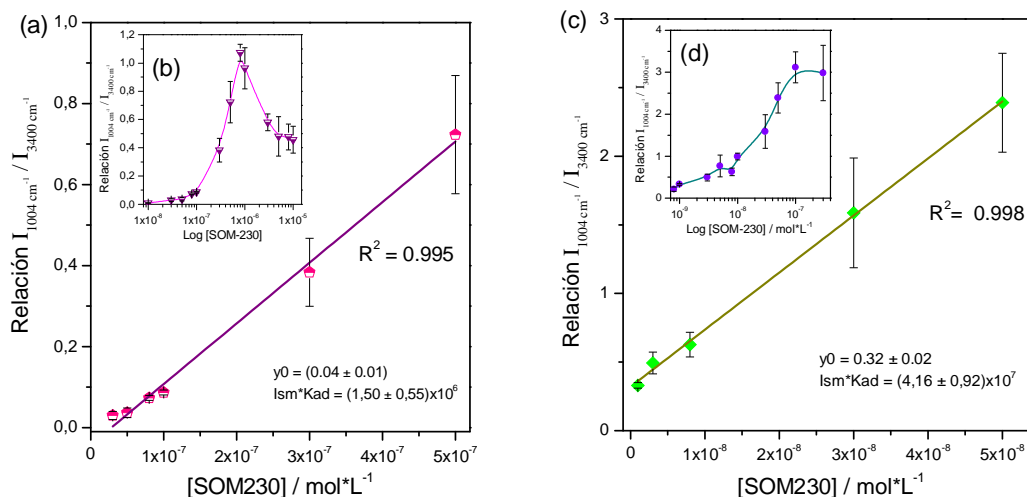


Figura 5.34: Representación de la intensidad de la banda a 1004 cm^{-1} de Phe frente a la concentración de SOM230 cuando se encuentra adsorbido sobre AgHxCl (a y b) y AuCT₅₀ (c y d). Las gráficas (a) y (c) corresponden a las regiones en las que se observa un comportamiento lineal entre la intensidad de la banda 1004 cm^{-1} y la concentración del péptido. Las NPs metálicas fueron activadas con KNO_3 a concentración (0.5M)

La fig. 5.34c muestra la variación de la intensidad de la banda a 1004 cm^{-1} del residuo de Phe para la zona de linealidad correspondiente a la región de bajas concentraciones ($3 \times 10^{-9} - 5 \times 10^{-8} \text{ M}$) del SOM230 adsorbido sobre NPs de Au. Por otra parte, la variación de banda marcadora con la variación de la concentración del SOM230 en un amplio rango de concentraciones ($3 \times 10^{-9} - 10^{-5} \text{ M}$) se muestra en la fig. 5.33d. Al igual que en el caso de Ag, esta variación indica que la adsorción de SOM230 sobre Au se aleja de un modelo de adsorción del tipo Langmuir, lo que confirma que también sobre este metal pueden darse los dos supuestos anteriores propuestos para la adsorción sobre Ag: formación de espacios interpartícula y/o adsorción en multicapas compitiendo con la adsorción sobre el metal.

A partir de las gráficas lineales de la fig. 5.34 es posible deducir el límite de detección de SOM230 sobre cada uno de los metales, que resultó ser 15.49 ppb para NPs de Ag y 27.37 ppb para NPs de Au. Por otra parte, la detección SERS del SOM230 presenta una sensibilidad sobre las NPs de Au de 4.16×10^7 , que es relativamente superior a la obtenida para la misma molécula sobre NPs de Ag (1.50×10^6). Este hecho indica que el péptido interacciona más fuertemente con la superficie de Au, ya que se forma un enlace covalente entre el N indólico del residuo de Trp y el metal. Sin embargo, la interacción del péptido SOM230 con Ag que se

deduce a partir de los espectros SERS es de naturaleza electrostática y ocurre mediante la formación de un par iónico entre los grupos amino protonados (NH_3^+) y los iones Cl^- adsorbido sobre el metal. Esta interacción es más débil, lo que explica el valor más bajo de la sensibilidad.

5.3.3 Adsorción del β -Amiloide y sus fragmentos sobre nanopartículas plasmónicas: Efecto sobre la fibrilación

Tres fragmentos distintos de la secuencia global del péptido β -Amiloide (βAm) con secuencias distintas fueron estudiados: βAm_{25-35} , βAm_{1-42} y βAm_{1-40} (fig. 2.10). El fragmento que se estudió con más detalle fue el de menor tamaño de los tres (βAm_{25-35}), (fig. 5.21 (a y d)). A diferencia del βAm_{25-35} , como ya se ha comentado anteriormente en el capítulo 2, los fragmentos de βAm_{1-42} y βAm_{1-40} presentan un comportamiento mayormente hidrófobo. Estos últimos fragmentos de la proteína de βAm son los que más han sido estudiados hasta el momento [157, 158, 219, 250-252]. Sin embargo, como ya se ha mencionado en el capítulo 2, la secuencia 25-35 del péptido β -Amiloide es el fragmento más pequeño que presenta actividad biológica. Además se trata del fragmento de menor longitud capaz de formar extensos agregados integrados por láminas beta, que provocan una elevada neurotoxicidad [165, 246, 253]. Por este motivo se decidió estudiar con mayor profundidad la secuencia 25-35 del péptido βAm , aunque también se realizaron experimentos con los fragmentos 1-42 y 1-40 mediante la técnica SERS.

I. Espectros de extinción

La fig. 5.35 muestra los espectros de extinción de las NPs de Ag del coloide AgHxCl empleadas en este estudio en presencia del fragmento βAm_{25-35} . Se observa que el espectro de extinción no experimenta ninguna variación significativa hasta que no se alcanza una concentración $3\ \mu\text{M}$ del péptido. Por encima de esa concentración se produce un cambio consistente en la disminución de intensidad de la banda T del coloide y su ensanchamiento. Sin embargo, no se aprecia la aparición de una banda neta L , como sí ocurre en los péptidos LAN y SOM230, ya que las bandas T y L no se encuentran resueltas. La deconvolución de la banda T/L muestra que la banda T se encuentra a 419 nm mientras que la L se localiza a 572 nm. La posición tan baja de la

banda *L* en comparación con los péptidos LAN y SOM230, para los que esta misma banda aparece en el intervalo 650-800 nm, está relacionada con la fibrilación del péptido βAm_{25-35} sobre las NPs. Aunque el fragmento 25-35 presenta una hidrofobicidad significativamente más baja que los fragmentos 1-42 y 1-40, puede formar oligómeros altamente ordenados dependiendo de la concentración a la que se encuentre. La incorporación de una molécula en una estructura lámina-beta ya estructurada induce a la formación de enlaces de hidrógeno entre cadenas, de tal forma que los oligómeros de βAm_{25-35} crecen de manera altamente organizada [247, 254]. La formación de oligómeros de βAm_{25-35} requiere de concentraciones relativamente altas en disolución (milimolar). Sin embargo, el péptido βAm_{25-35} puede formar agregados sobre las NPs a concentraciones mucho más bajas que las requeridas en disolución, debido al efecto de la difusión hacia la interfase, que genera una acumulación de moléculas de péptido sobre la superficie por aumento drástico de la concentración a nivel local sobre la nanopartícula.

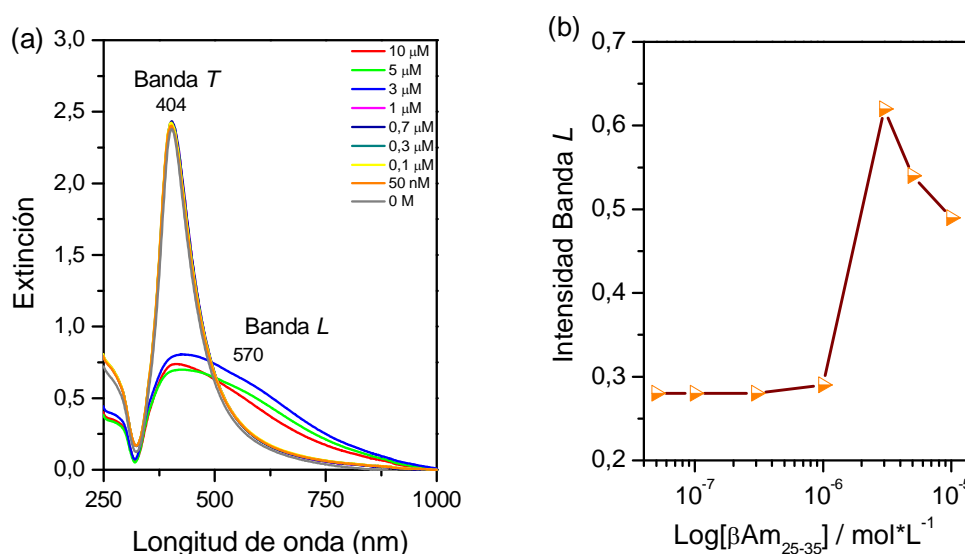


Figura 5.35: Espectros de extinción del coloide AgHxCl, activado con KNO_3 a 0.5 M en presencia del péptido βAm_{25-35} a diferentes concentraciones (a). Variación de la intensidad la Banda *L* con la concentración del péptido βAm_{25-35} (b).

Los espectros de extinción de la fig. 5.34 indican que existen diferentes efectos del péptido sobre las NPs según la concentración. A bajas concentraciones del péptido ($< 3\mu\text{M}$), la agregación de NPs no se produce, debido a que la adsorción de βAm_{25-35} tiene lugar de tal manera que induce un desacoplamiento de los plasmones de las NPs

[254-257]. A altas concentraciones ($> 3 \mu\text{M}$) la adsorción sí produce un acercamiento de NPs y lo que se observa es que al adicionar el péptido sobre las NPs la suspensión de AgHxCl se agrega rápidamente. Este efecto se observa con más claridad cuando se representa la variación de la intensidad de la banda de extinción a 570 nm con la concentración (fig. 5.35b).

II. Microscopía Electrónica de Transmisión

La imagen TEM mostrada en la fig. 5.36a presenta una vista general del sistema $\beta\text{Am}_{25-35}/\text{Ag NP}$ a una concentración del péptido de $10 \mu\text{M}$. Como puede observarse, las NPs de Ag aparecen rodeadas de una película en forma de corona que corresponde al péptido adsorbido sobre la superficie. Además, se aprecia la existencia de pequeñas estructuras esféricas de mayor contraste no adsorbidas sobre las NPs (indicadas con flechas rojas) y que se encuentran embebidas en la corona peptídica descrita anteriormente. Estas estructuras esféricas podrían corresponder a la formación de agregados oligoméricos del péptido βAm_{25-35} . El diámetro medido para las NPs de Ag de la imagen (a) en la fig. 5.36 es de $50 \pm 10 \text{ nm}$, el grosor de la corona peptídica de $6 \pm 1 \text{ nm}$ y el diámetro de las estructuras esféricas asociadas a los oligómeros del péptido de βAm_{25-35} es de $7 \pm 1 \text{ nm}$.

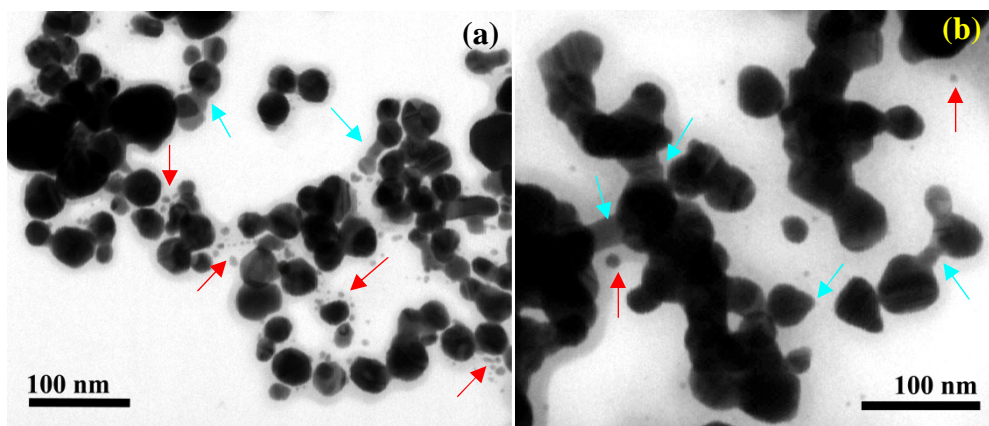


Figura 5.36: Imágenes TEM de βAm_{25-35} en presencia de NPs de Ag (coloide AgHxCl) activadas con KNO_3 (0.5 M) a diferentes concentraciones del péptido: $10 \mu\text{M}$ (a) y $2 \mu\text{M}$ (b).

A una concentración cinco veces menor (fig. 5.36b) que corresponde a un valor por debajo de la concentración crítica para observar variación en el espectro de extinción ($2 \mu\text{M}$), el aspecto del coloide es totalmente distinto. En este caso se observa un

número mucho menor de partículas esféricas (marcadas con una flecha roja en la figura). Por otra parte, aunque el aspecto de los agregados es de una alta compacidad, una observación más detallada de los agregados revela la existencia de unas estructuras alargadas que unen unas partículas con otras (indicadas con flechas azules en la imagen). Estas estructuras son de menor contraste que las NPs de Ag, por lo que es muy probable que sean de naturaleza orgánica. Estas formaciones podrían corresponder a fibrillas del péptido que se forman en estas condiciones y que mantienen las NPs alejadas evitando el acoplamiento plasmónico entre las diferentes NPs, lo que explica que a bajas concentraciones no se observe la banda *L*.

Con el fin de entender las estructuras que aparecen en las imágenes de la fig. 5.36, se ha investigado el proceso de fibrilación del amiloide a partir de los trabajos publicados hasta la fecha. La fig. 5.37 muestra el esquema de la fibrilación según aparece en el trabajo publicado por Peng y col. Según este trabajo el proceso de formación de fibrillas se produce a partir de las unidades monoméricas, pasando por las diferentes fases de nucleación y crecimiento que dan lugar a estructuras de diferente morfología (dímero, oligómero y protofibrilla) hasta llegar a la formación de fibrillas maduras.

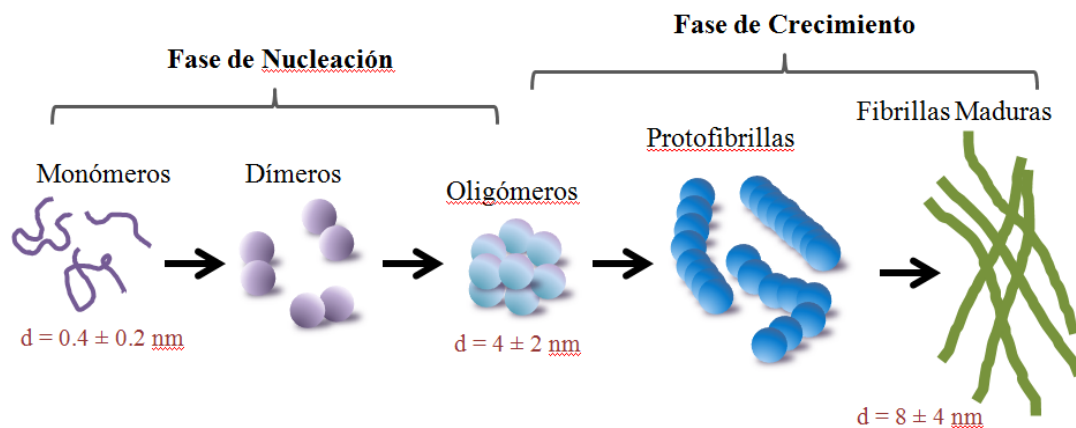


Figura 5.37: Esquema propuesto del proceso de formación del amiloide desde monómeros, oligómeros hasta fibrillas.

Para el caso de los oligómeros y las protofibrillas el tamaño medio de las estructuras es $4 \pm 2 \text{ nm}$, mientras que el tamaño medio en las fibrillas maduras es de $8 \pm 4 \text{ nm}$. Los agregados esféricos que se observan en la fig. 5.36, señalizados con las flechas rojas tienen un diámetro de $7 \pm 2 \text{ nm}$, por lo que podrían corresponder a agregados del tipo oligómeros y protofibrillas descritos por Peng y col. Asimismo, las

estructuras de mayor tamaño observadas en la imagen 5.36b podría corresponder a la formación de fibrillas que crecen sobre el metal separando las NPs. La observación de fibrillas a bajas concentraciones y partículas esféricas a altas parece en principio estar en contradicción, ya que estas últimas estructuras se deberían formar en las primeras fases de la fibrilación. Una posible explicación a este fenómeno es la competencia existente entre la interacción del péptido con el metal en la adsorción y la interacción intermolecular que da lugar al proceso de fibrilación. A concentraciones altas del amiloide se produce primero una asociación de moléculas fuera de la superficie de las NPs, lo que da lugar a las partículas esféricas. Sin embargo, a bajas concentraciones esta asociación está limitada por el menor número de moléculas de péptido, cuya adsorción sobre el metal está más favorecida generando estructuras que crecen desde la interfase metálica.

III. Espectroscopía Raman Intensificada por Superficie

a) Péptido β Am₂₅₋₃₅:

El análisis de los espectros SERS obtenidos para el péptido β Am₂₅₋₃₅ en presencia de las NPs de Ag permitió estudiar la forma de interacción de la molécula con la superficie metálica. Comparando las bandas marcadoras del espectro SERS con el espectro Raman del sólido de la molécula se pudo proponer una posible forma de orientación del adsorbato sobre la superficie metálica.

En el espectro Raman del sólido de β Am₂₅₋₃₅ (fig. 5.38a) se identificaron las bandas relacionadas con el esqueleto peptídico. Las bandas de amidas I y III aparecen a las frecuencias de 1667 y 1280 – 1230 cm^{-1} , respectivamente. El resto de las bandas se deben a las cadenas laterales de los aminoácidos del péptido. Así por ejemplo, las bandas que aparecen a las frecuencias de 1344, 1318 y 1124 cm^{-1} pueden asociarse a la Lys [244, 258] y las bandas a 728 y 647 cm^{-1} se asignan al estiramiento C-S bajo la conformación *trans* en la Met [259, 260]. La banda asociada a las deformaciones –CH₂ aparecen a la frecuencia de 1442 cm^{-1} , que para el caso en particular de este péptido es muy intensa debido a la presencia de los aminoácidos Leu y Ile, los cuales le proporciona a la molécula un carácter alifático.

La fig. 5.38 muestra los espectros SERS a diferentes concentraciones de β Am₂₅₋₃₅ y una ampliación de la región correspondiente a la amida III de la cadena peptídica de la

molécula a dos concentraciones diferentes. Las bandas que aparecen a las frecuencias de 1035, 980 y 913 cm^{-1} relacionadas con los grupos $\nu(\text{C-CH}_2)$, $\nu(\text{CC})$ y $\nu(\text{C-COO}^-)$, respectivamente, aumentan su intensidad relativa en los espectros SERS [210, 261].

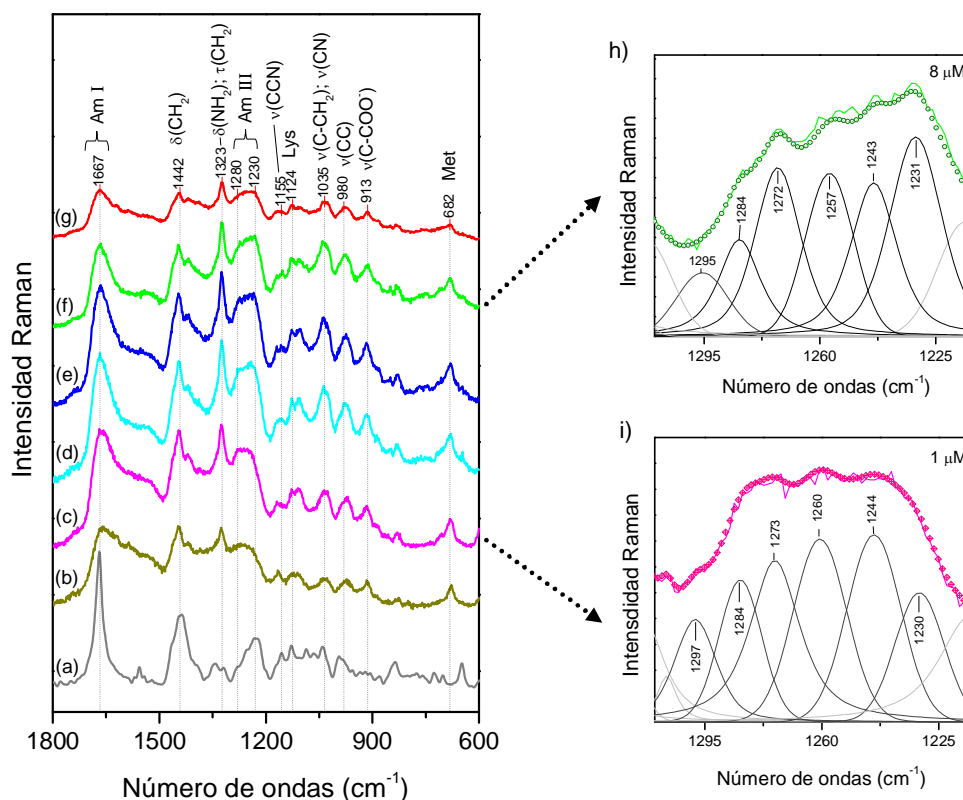


Figura 5.38: Espectro Raman del βAm_{25-35} sólido (a). Espectros SERS del βAm_{25-35} sobre AgHxCl activado con KNO_3 (0.5 M) a diferentes concentraciones; 0.8 μM (b), 1 μM (c), 3 μM (d), 5 μM (e), 8 μM (f), 10 μM (g). Derecha: Deconvolución de las bandas en la región 1300-1200 cm^{-1} (Amida III) de los espectros SERS para las concentraciones: 8 μM (h) y 1 μM (i). Excitación a 532 nm.

Las bandas asociadas a la cadena lateral del residuo Lys que aparecen a las frecuencias de 1323 y 1124 cm^{-1} se intensifican notablemente en los espectros SERS con respecto al Raman normal del péptido siendo la banda a 1323 cm^{-1} , asociada a vibraciones $\nu(\text{C-NH}_2)$, la más intensa de las tres [258]. Por otra parte, las bandas correspondientes a la vibración $\nu(\text{C-S})$ del residuo Met que en el espectro Raman normal del sólido aparecen a 728 y 647 cm^{-1} , asociadas a la conformación *trans* alrededor del enlace C-S, se modifica apareciendo en los espectros SERS una única banda a 682 cm^{-1} . La aparición de esta banda, con intensidad ligeramente mayor que en el espectro del sólido, indica que la cadena lateral de la Met se encuentra cerca de la

superficie metálica, orientándose de manera perpendicularmente a ella adoptando una conformación *trans-gauche* (P_H -T) alrededor del enlace C-S [260, 262, 263]. El análisis de los espectros SERS y Raman en su conjunto permiten concluir que el péptido βAm_{25-35} interacciona con la superficie metálica a través del grupo $-NH_3^+$ de la cadena lateral de Lys. Esta interacción ocurre de manera simultánea al acercamiento de la cadena lateral de la metionina a la superficie.

En la fig. 5.38 (h-i) se muestra la deconvolución de la banda correspondiente a la Amida III del esqueleto peptídico de βAm_{25-35} a dos concentraciones diferentes de adsorbato: 8 y 1 μM . Como es bien sabido, esta banda es un marcador estructural de péptidos y proteínas, ya que su posición depende de la estructura tridimensional de la cadena polipeptídica [218, 219]. Por lo tanto, su análisis es de gran interés para investigar la estructura del péptido βAm_{25-35} cuando se encuentra adsorbido sobre las NPs. La tabla 5.6 muestra el resultado de la deconvolución aplicada junto con la asignación de las bandas resultantes en la región $1300-1200\text{ cm}^{-1}$.

A partir de la deconvolución de la banda Amida III para el caso del βAm_{25-35} en presencia de NPs de plata se deduce que la organización del péptido sobre la superficie metálica puede cambiar en dependencia de la concentración del mismo. Este tipo de diferencias puede implicar que la estructura que del péptido sobre la superficie adopte configuraciones distintas si se encuentra a concentraciones diferentes.

Tabla 5.6: Deconvolución de la banda Amida III con la contribución porcentual de las diferentes estructuras secundarias resultantes obtenidas a partir de los espectros SERS del βAm_{25-35} sobre NPs de Ag a una λ de excitación de 532 nm (fig. 5.38 (h-i)).

$[\beta Am_{25-35}]$ (μM)	<i>Random</i> 1272 cm^{-1}	<i>Codos (β-turn)</i> 1257-1295 cm^{-1}	<i>B-sheet</i> 1243 cm^{-1}	<i>β-strand</i> 1230 cm^{-1}	Total
8	20	35	19	26	100
1	22	43	21	14	100

Para el caso en que el βAm_{25-35} se encuentra a una concentración elevada (8 μM) la mayor contribución (26 %) de estructura secundaria tipo β se obtiene para el elemento *β -strand*, el cual aparece a 1230 cm^{-1} [264, 265]. Por el contrario, a una concentración más baja (1 μM) la contribución de este tipo de estructura es del 14 %. En un intento de correlacionar los espectros SERS con las imágenes TEM de la fig. 5.36, se observa que el péptido a una concentración 10 μM parece organizarse formando los

aglomerados con una apariencia esférica (fig. 5.36a), que sugiere la presencia del péptido con una estructura secundaria β -strand más organizada, en las cuales el péptido se encuentra formando cadenas beta anti-paralelas [266-268]. Sin embargo, a concentraciones más bajas (1 μ M) se puede observar un aumento en la contribución de la forma β -sheet (21 %) lo que puede sugerir un cambio en la conformación estructural del péptido sobre la superficie metálica, además la forma de contribución tipo codo (β -turn) aumenta un 8 % respecto al caso de mayor concentración, lo que pudiera estar relacionado con una pérdida en la organización de la estructura secundaria del péptido, ya que a concentraciones más bajas hay menos interacción molécula-molécula y se desestabiliza la estructura [268]. En estas condiciones la interacción péptido-metal prevalece dando como resultado las fibrillas observadas en la imagen TEM de la fig. 5.36b. D'Ursi y colaboradores estudiaron las diferentes conformaciones estructurales del péptido β Am₂₅₋₃₅ en diferentes medios cambiando la polaridad del entorno que lo rodea mediante cálculos teóricos de Resonancia Magnética Nuclear (RMN). Para una mezcla agua/hexafluoroisopropanol (H₂O/HFIP) 80/20 v/v simulando condiciones de polaridad determinadas, observaron que la molécula adoptaba una estructura tipo β -turn que involucra una interacción entre los aminoácidos Gly²⁵ y Asn²⁸ mediante enlace de hidrógeno [269]. Teniendo en cuenta esta consideración, es de esperar en disolución acuosa (medio polar) la conformación del péptido presente una estructura β -turn entre los aminoácidos 25-28. Sin embargo, en presencia de NPs metálicas el péptido se agrega formando láminas-beta de características diferentes en dependencia de la concentración a la que se encuentre en disolución. Por lo tanto, estos resultados indican que las NPs afectan en el proceso de fibrilación de manera efectiva, provocando una agregación del péptido a bajas concentraciones (< 2 μ M), mientras que a concentraciones por encima de este umbral se produce una agregación diferente fuera de las NPs. Este fenómeno explicaría los cambios observados en los espectros de extinción.

IV. Isoterma de adsorción

El estudio SERS del péptido de β Am₂₅₋₃₅ permitió también deducir el mecanismo de adsorción del péptido sobre las NPs de Ag, a partir del análisis de los cambios en los SERS con respecto al espectro Raman del péptido en estado sólido. La fig. 5.38a muestra la variación de la intensidad de la banda marcadora a 1445 cm⁻¹ en los

espectros SERS del péptido βAm_{25-35} en presencia de NPs de Ag en todo el intervalo de concentraciones estudiado ($0.5 - 10 \mu\text{M}$).

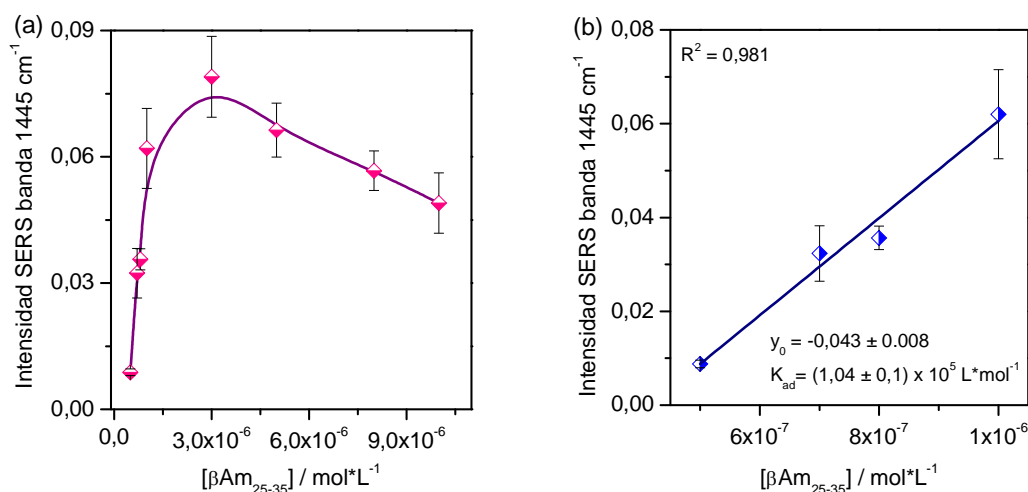


Figura 5.39: Variación de la intensidad de la banda marcadora SERS a 1445 cm^{-1} del péptido βAm_{25-35} (normalizada a la banda 3400 cm^{-1} del H_2O) con la concentración en AgHxCl activado con KNO_3 (0.5 M) (a). Recta de calibrado obtenida a partir de la variación de la intensidad de la banda a 1445 cm^{-1} con la concentración del péptido βAm_{25-35} en AgHxCl en la región 5×10^{-7} - 10^{-6} M (b). Excitación a 532 nm .

El tipo de adsorción que describe el péptido de βAm_{25-35} no es del tipo Langmuir, pues el mecanismo de adsorción del péptido sobre las NPs de Ag es más complejo, debido a las fuertes interacciones que se producen entre las moléculas del péptido en los procesos de agregación que se han comentado anteriormente. En este caso la complejidad de adsorción del péptido sobre la superficie metálica viene dada por la competencia que existe entre las propias moléculas de βAm_{25-35} por formar los agregados del tipo oligómeros, observados por microscopía electrónica (fig. 5.36) y la adsorción de las moléculas péptido βAm_{25-35} sobre la superficie de las NPs de Ag. Este comportamiento difiere de los péptidos LAN y SOM230, donde la complejidad de adsorción sobre las NPs metálicas viene dada por los diferentes puntos de anclaje a la superficie que presentan estos y no a los procesos de fibrilación.

A bajas concentraciones del péptido la variación de la intensidad de la banda marcadora SERS a 1445 cm^{-1} con la concentración del péptido presenta un comportamiento lineal, aunque hay que resaltar que la región de linealidad encontrada para este sistema ($\beta\text{Am}_{25-35}/\text{AgHxCl}$) ($0.5 - 1 \mu\text{M}$) es más restringida que la

correspondiente a los péptidos LAN y SOM230. En la fig. 5.39b se muestra la recta de calibrado del βAm_{25-35} en presencia de AgHxCl activado previamente con KNO_3 (0.5 M). La sensibilidad de la técnica SERS en la detección del βAm_{25-35} $(1.04 \pm 0.1) \times 10^5$ es mucho menor que la obtenida para los péptidos LAN y SOM230. No obstante, esta sensibilidad es alta comparada con otros fragmentos del péptido de βAm que no muestran ninguna o muy poca afinidad por la superficie de las NPs metálicas. De la gráfica 5.39b se pudo deducir el límite de detección del βAm_{25-35} en NPs de Ag, que resultó ser 1387 ppb. Este valor de LOD deducido para el βAm_{25-35} es mucho mayor que los obtenidos para los péptidos LAN (107 ppb) y SOM230 (15.5 ppb) en las mismas condiciones de medida. Este hecho se atribuye al mecanismo de adsorción que presentan los péptidos sobre la superficie de Ag. Así mientras que para el caso de βAm_{25-35} esta interacción es más débil, ya que presenta solo un grupo amino cargado aportado por el residuo Lys por el cual interacciona con las NPs de Ag, mientras que el péptido LAN presenta hasta dos puntos de anclaje a la superficie (el grupo amino del residuo Lys y el grupo amino que se encuentra en la posición 1 cerca del grupo Naph) al igual que el péptido SOM230 que presenta dos grupos amino en su estructura (residuo de Lys y grupo amino en la posición 7) disponibles para interactuar con la superficie metálica.

b) Péptidos βAm_{1-42} y βAm_{1-40} :

La fig. 5.40 muestra el espectro Raman del sólido y el SERS de los péptidos βAm_{1-40} (A) y βAm_{1-42} (B) registrados en modo “micro”. Los espectros SERS en modo “macro” no pudieron ser obtenidos utilizando los coloides AgHxCl y NSAg . Esto se debe a la alta hidrofobicidad que presentan estos péptidos, ya que existe gran cantidad de aminoácidos alifáticos en su estructura, lo que hace que presenten una baja afinidad por la superficie hidrofílica de las NPs de Ag. Sin embargo, para el caso del fragmento βAm_{1-40} se encontraron unas condiciones experimentales óptimas en modo “micro” gracias a las cuales se pudieron obtener buenos resultados SERS utilizando como sustrato las nanoestrellas de plata.

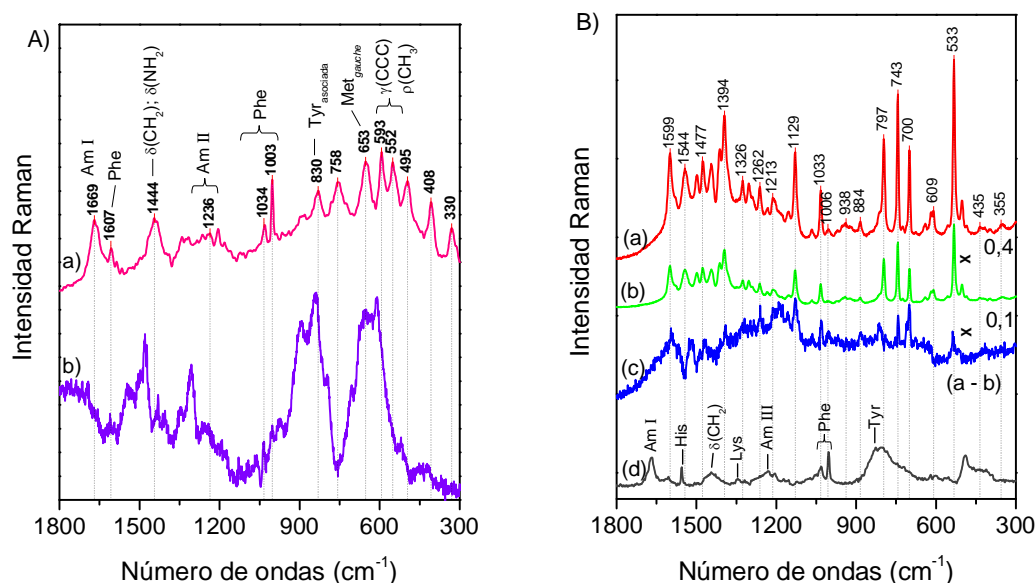


Figura 5.40: A) Espectros Raman del péptido βAm_{1-40} : Raman normal en estado sólido (a) y SERS sobre NSAg205 a una $[\beta\text{Am}_{1-40}]$ de 0.22 μM en modo “micro” (b). Excitación a 633 nm. B) Espectro SERS del complejo ThT: βAm_{1-42} a la concentración [5:0.22] μM en coloide de NSAg205 (a); espectro SERS de [ThT] a 5 μM en presencia de NSAg205 (b); espectro diferencia de (a - b) (c) y espectros Raman normal del βAm_{1-42} en estados sólido. Excitación a 532 nm.

El fragmento βAm_{1-40} da lugar a un espectro SERS cuando se usaron nanoestrellas NSAg205 dominado por intensas y anchas bandas alrededor de 600 y 900 cm^{-1} , que podrían ser debidas a iones presentes en la mezcla.

El fragmento βAm_{1-42} también fue los experimentos SERS se realizaron utilizando también el coloide de nanoestrellas NSAg205 (sección 4.3.1). En este caso se llevó a cabo una medida SERS indirecta basada en el empleo del marcador ThT. El uso de las nanoestrellas NSAg205 como sustrato para el SERS tiene un valor añadido en este caso, pues la presencia de las moléculas de citrato como producto de la oxidación en la obtención de las NPs de Ag, evitan que la ThT se adsorba sobre la superficie metálica eficazmente (sección 5.2.1). La fig. 5.40B muestra los espectros SERS del complejo ThT/ βAm_{1-42} (fig. 5.40a) y de ThT (fig. 5.40b). Los resultados muestran que al haber una concentración de citrato diez veces menor en el coloide NSAg205 se logra una aproximación suficiente del péptido a la superficie metálica para obtener un espectro SERS de calidad aceptable. Con el fin de analizar la interacción de ThT con el péptido βAm_{1-42} , se obtuvo el espectro diferencia entre el SERS del complejo ThT/ βAm_{1-42} y

el espectro SERS de ThT (fig. 5.40c). El espectro diferencia muestra bandas positivas a 1596, 1397, 1129, 1034, 1002, 817, 742, 701 y 530 cm^{-1} , donde las bandas a 1596, 1397, 1129 y 530 cm^{-1} están asociadas a la forma ThT₁, en la que la molécula de ThT adopta un ángulo de 90° entre las dos mitades aromáticas (benzotiazol y aminobenceno, fig. 5.19b, mientras que las bandas a 1034 y 1002 cm^{-1} están asociadas al residuo Phe [270-272]. Por otra parte, la banda a 817 cm^{-1} puede estar asociada al residuo Tyr que se encuentra interaccionando con la ThT a través de los electrones π de los anillos aromáticos y desplazándose desde 830 cm^{-1} hasta 817 cm^{-1} . Este efecto demuestra que la interacción del péptido consigue retirar moléculas de ThT de la superficie dando como resultado un mayor peso en los espectros SERS resultantes de moléculas del marcador que se encuentran interaccionando con el péptido. Las bandas positivas observadas en el espectro de la fig. 5.39c parecen corresponder a la ThT unida al péptido, cuyo espectro SERS resulta ser diferente al de ThT unida a la NP metálica. Por lo tanto, este resultado constituye un punto de partida prometedor para la posible detección de péptidos amiloides a bajas concentraciones usando medidas indirectas del colorante histológico mediante la técnica SERS.

6. Conclusions

6. CONCLUSIONS

✓ The silver star-shaped nanoparticles fabricated by chemical reduction method reported in this Thesis, give rise to Ag nanostars (NSAg) with excellent plasmonic properties to provide a high SERS activity. A large number of NSAg nanoparticles preparations, 24 in total, were obtained by changing the fabrication parameters e.g. hydroxylamine, silver nitrate, citrate and the lapse reduction time (T_1). The morphological analysis of resulting NSAg revealed that they are formed by a core from which several arms are expanded, being the length of these arms subjected to modification by controlling the concentration of reagents and the reduction time.

✓ The NSAg reported in this Thesis exhibit interesting plasmonic activity: a) a large SERS performance as demonstrated by using tiophenol as probe molecule; and b) a broad plasmon resonance, ranging from the blue region towards the red-NIR region that allows a successful application of these substrates in a broader region of the electromagnetic spectrum.

✓ Hollow bimetallic nanostars (NSAgAu) with different morphologies were successfully prepared by a method combining the classical chemical reduction and the galvanic replacement method. Four preparation methods were employed by changing the relative Au/Ag concentration ratio, as well as the concentration of the two employed chemical reductors (hydroxylamine and citrate). These systems exhibit a high SERS activity demonstrated by the intense spectroscopic signals obtained by using Thioflavin T as probe molecule.

✓ A detailed morphological analysis of all these substrates revealed that, the size of the resulting nanostructures, as well as the arm thickness, become higher by increasing the available amount of Ag^+ ions. The average number of arms in NSAgAu are eight, indicating that these NPs are initially grown from octahedral-shaped NPs, and the average diameters range from 30 nm to 350 nm with an Ag/Au shell thickness of 3–10 nm.

✓ The plasmonic resonance and, hence, the SERS activity of the prepared NS is extremely sensitive to changes in shape and size which can be tuned on the basis of the different methods employed.

✓ The hollow bimetallic star-shaped NPs have a SERS activity in all the visible and near IR regions. These nanostars are integrated by an alloy of both Au and Ag in the shell. The sample NSAgAu1 exhibits the maximum intensification of the SERS spectrum in the red spectral region, whereas the sample NSAgAu3 are more active by using the 532 nm excitation line. This is due to the significant modification in the extinction spectra depending on the different morphology.

✓ The nanostar nanoparticles (NSAg and NSAgAu) fabricated in this work can be successfully applied in SERS spectroscopy because of two reasons: a) they exhibit clean adsorption surfaces, free of strong surfactants usually employed to fabricate other types of nanostars, thus allowing the easy adsorption of analytes; and b) the aggregation is not necessary because of the large intensification provided by their special morphology. Thus, they present interesting substrates to carry out quantitative detection of analytes.

✓ Although the obtained NS exhibit interesting physical properties that make them suitable SERS substrates, the method employed for their preparation also plays an important role in the SERS intensity, because of the different chemical composition of interfaces resulting from each colloid method of preparation. This is due to the different surface zeta potential and the presence of residual adsorbed species. Unfortunately, the nanostars fabricated in the present Thesis cannot be applied in the study of oligopeptides studied here due to the interference of the large amount of residual citrate that was needed to obtain the star-like morphology.

✓ The histological dyes used for detection of amyloid fibrils Congo Red (CR) and Thioflavin T (ThT) could be successfully studied by SERS on both NSAg and NSAgAu. The adsorption study and quantitative analysis of these dyes was performed on the latter substrates, and this represents a promising result for the indirect analysis of fibrinogen peptides.

✓ The adsorption study of CR and ThT was made by building the adsorption isotherms, which govern the dependence of SERS intensity on the surface coverage. These isotherms revealed that the adsorption of these histological dyes followed a Langmuir-like model, thus indicating that the intermolecular interaction on the surface is negligible. From the linear part of these isotherms the limit of detection of these molecules was deduced, being 28.4 and 609 ppb for CR and ThT respectively.

✓ The adsorption of fibrogenic peptides (LAN and SOM230) and its quantitative analysis by SERS was only possible on silver and gold spherical NPs with no citrate or with a low concentration of this anion on the surface. The adsorption mechanism of these peptides on the active SERS nanoparticles depends on the biomolecule concentration and also on the nature of metals.

✓ The LAN and SOM230 peptides interact with the silver surface through electrostatic forces resulting from the formation of ionic pairs between amino groups and the adsorbed Cl^- ion. These peptides present two different amino binding sites on Ag surface. This effect is an important issue to take into account in the NPs functionalization of these systems with peptides, as the cellular binding site of these biomolecules must be free for cellular linking in drug delivery and theranostic purposes.

✓ The adsorption isotherms obtained by the SERS study of the LAN and SOM230 peptides fit an anti-Langmuir due to the nanoparticle linking induced by these peptides and the formation of multilayers. The limit of detection of these peptides reached the value of 10-100 ppb, thus demonstrating the high sensitivity of the technique in the detection of these biomolecules.

✓ Among the β -Amyloid peptides studied by SERS, the shorter fragment (βAm_{25-35}) provided the best results due to its lower hydrophobicity. The analysis of SERS spectra suggests that this peptide is adsorbed on Ag through the Lys residue, being the Met residue close to the surface. The presence of NPs markedly affects the peptide fibrillation that could be studied by SERS. The analysis of the amide III band and the TEM images suggest that at low concentration this peptide tends to fibrillate due to the adsorption on the surface. On the contrary, at high concentrations the proportion of β -

sheet is lower and the peptide could aggregate in regions out of the NPs forming oligomers aggregates.

✓ The SERS analysis of βAm_{1-40} and βAm_{1-42} peptides only was possible by using micro-SERS. In the case of βAm_{1-42} an interaction with the histological dye ThT was deduced from the SERS spectra that is a promising result in future applications of SERS in the diagnostic of amyloid-related diseases.

7. Bibliografía

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Masters, C.L., et al., *Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1985. **82**(12): p. 4245-4249.
2. Walsh, D.M., et al., *Amyloid- β oligomers: their production, toxicity and therapeutic inhibition*. Biochemical Society Transactions, 2002. **30**(4): p. 552-557.
3. D. Howes, P., S. Rana, and M. M. Stevens, *Plasmonic nanomaterials for biodiagnostics*. Chemical Society Reviews, 2014. **43**(11): p. 3835-3853.
4. Gagner, J.E., et al., *Effect of gold nanoparticle morphology on adsorbed protein structure and function*. Biomaterials, 2011. **32**(29): p. 7241-7252.
5. Gebauer, J.S., et al., *Impact of the nanoparticle-protein corona on colloidal stability and protein structure*. Langmuir, 2012. **28**(25): p. 9673-9679.
6. Dolores, R., S. Raquel, and G.L. Adianez, *Sonochemical synthesis of iron oxide nanoparticles loaded with folate and cisplatin: Effect of ultrasonic frequency*. Ultrasonics Sonochemistry, 2015. **23**: p. 391-398.
7. Liz-Marzan, L.M., C.J. Murphy, and J. Wang, *Nanoplasmonics*. Chemical Society Reviews, 2014. **43**(11): p. 3820-3822.
8. Wiley, B., et al., *Shape-Controlled Synthesis of Metal Nanostructures: The Case of Silver*. Chemistry – A European Journal, 2005. **11**(2): p. 454-463.
9. Guerrini, L., et al., *Functionalization of Ag nanoparticles with the bis-acridinium lucigenin as a chemical assembler in the detection of persistent organic pollutants by surface-enhanced Raman scattering*. Analytica Chimica Acta, 2008. **624**(2): p. 286-293.
10. Kubackova, J., et al., *Sensitive Surface-Enhanced Raman Spectroscopy (SERS) Detection of Organochlorine Pesticides by Alkyl Dithiol-Functionalized Metal Nanoparticles-Induced Plasmonic Hot Spots*. Analytical Chemistry, 2015. **87**(1): p. 663-669.
11. Aroca, R.F., M. Campos Vallette, and J.V. García Ramos, *Amplificación plasmónica de espectros Raman y de fluorescencia: SERS y SEF sobre nanoestructuras metálicas* 2014, España: Editorial CSIC Consejo Superior de Investigaciones Científicas.
12. Herrmann, R. and C. Onkelinx, *Quantities and units in clinical chemistry: Nebulizer and flame properties in flame emission and absorption spectrometry.*, in *Pure and Applied Chemistry* 1986. p. 1737.
13. Urban, M.W., *Vibrational spectroscopy of molecules and macromolecules on surfaces* 1993: Wiley.
14. Faraldos, M. and C. Goberna, *Técnicas de análisis y caracterización de materiales*, 2002, Consejo Superior de Investigaciones Científicas.
15. Arias Montenegro, F.J., *Capas de CuInSe₂ para células solares: análisis por espectroscopia Raman de capas pobres en Cu*. 2009.
16. Gardiner, D., *Introduction to Raman Scattering*, in *Practical Raman Spectroscopy*, D. Gardiner and P. Graves, Editors. 1989, Springer Berlin Heidelberg. p. 1-12.

17. Kong, K., et al., *Raman spectroscopy for medical diagnostics - From in-vitro biofluid assays to in-vivo cancer detection*. Adv Drug Deliv Rev, 2015(0).
18. Fleischmann, M., P.J. Hendra, and A.J. McQuillan, *Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode*. Chemical Physics Letters, 1974. **26**(2): p. 163-166.
19. Jeanmaire, D.L. and R.P. Van Duyne, *Surface raman spectroelectrochemistry: Part I. Heterocyclic, aromatic, and aliphatic amines adsorbed on the anodized silver electrode*. Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry, 1977. **84**(1): p. 1-20.
20. Albrecht, M.G. and J.A. Creighton, *Anomalously intense Raman spectra of pyridine at a silver electrode*. Journal of the American Chemical Society, 1977. **99**(15): p. 5215-5217.
21. Ritchie, R.H., *Plasma Losses by Fast Electrons in Thin Films*. Physical Review, 1957. **106**(5): p. 874-881.
22. Barnes, W.L., A. Dereux, and T.W. Ebbesen, *Surface plasmon subwavelength optics*. Nature, 2003. **424**(6950): p. 824-830.
23. Chou, C.-H. and F.-C. Chen, *Plasmonic nanostructures for light trapping in organic photovoltaic devices*. Nanoscale, 2014. **6**(15): p. 8444-8458.
24. Maier, S.A., *Plasmonics: Fundamentals and Applications* 2007: Springer US. 224.
25. Halas, N.J., et al., *Plasmons in strongly coupled metallic nanostructures*. Chemical reviews, 2011. **111**(6): p. 3913-3961.
26. Comin, A. and L. Manna, *New materials for tunable plasmonic colloidal nanocrystals*. Chemical Society Reviews, 2014. **43**(11): p. 3957-3975.
27. Fraire, J.C., L.A. Pérez, and E.A. Coronado, *Cluster Size Effects in the Surface-Enhanced Raman Scattering Response of Ag and Au Nanoparticle Aggregates: Experimental and Theoretical Insight*. The Journal of Physical Chemistry C, 2013. **117**(44): p. 23090-23107.
28. Cialla, D., et al., *Surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS): progress and trends*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2012. **403**(1): p. 27-54.
29. Bohren, C.F. and D.R. Huffman, *Absorption and Scattering of Light by Small Particles* 2008: Wiley.
30. Kerker, M. and E.M. Loeb, *The Scattering of Light and Other Electromagnetic Radiation: Physical Chemistry: A Series of Monographs* 2013: Elsevier Science.
31. Rodríguez-Oliveros, R. and J.A. Sanchez-Gil, *Localized surface-plasmon resonances on single and coupled nanoparticles through surface integral equations for flexible surfaces*. Optics Express, 2011. **19**(13): p. 12208-12219.
32. Rodríguez-Oliveros, R. and J.A. Sanchez-Gil, *Gold nanostars as thermoplasmonic nanoparticles for optical heating*. Optics Express, 2012. **20**(1): p. 621-626.
33. Giannini, V., R. Rodríguez-Oliveros, and J. Sánchez-Gil, *Surface Plasmon Resonances of Metallic Nanostars/Nanoflowers for Surface-Enhanced Raman Scattering*. Plasmonics, 2010. **5**(1): p. 99-104.
34. Raguin, L., T. Samrowski, and C. Hafner. *Plasmon resonances of bimetal nanostructures with tunable optical properties*. 2010.

35. Wokaun, A., *Surface enhancement of optical fields*. Molecular Physics, 1985. **56**(1): p. 1-33.
36. Schütz, M., et al., *Hydrophilically stabilized gold nanostars as SERS labels for tissue imaging of the tumor suppressor p63 by immuno-SERS microscopy*. Chemical Communications, 2011. **47**(14): p. 4216-4218.
37. Senthil Kumar, P., et al., *High-yield synthesis and optical response of gold nanostars*. Nanotechnology, 2008. **19**(1).
38. Khoury, C.G. and T. Vo-Dinh, *Gold Nanostars For Surface-Enhanced Raman Scattering: Synthesis, Characterization and Optimization*. The Journal of Physical Chemistry C, 2008. **112**(48): p. 18849-18859.
39. Liu, X.-L., et al., *Tuning Plasmon Resonance of Gold Nanostars for Enhancements of Nonlinear Optical Response and Raman Scattering*. The Journal of Physical Chemistry C, 2014. **118**(18): p. 9659-9664.
40. Aroca, R., *Surface-Enhanced Vibrational Spectroscopy* 2007: John Wiley & Sons, Ltd.
41. García-Ramos, J.V., *Mecanismo Electromagnético del efecto SERS*. Optica pura y aplicada, 2004.
42. Fritzsche, W. and J. Popp, *Optical Nano- and Microsystems for Bioanalytics* 2012: Springer Berlin Heidelberg.
43. Suétaka, W. and J.T. Yates, *Surface Infrared and Raman Spectroscopy: Methods and Applications* 2013: Springer US.
44. Moskovits, M., *Surface-enhanced Raman spectroscopy: a brief retrospective*. Journal of Raman Spectroscopy, 2005. **36**(6-7): p. 485-496.
45. Guerrini, L., *Funcionalización de nanopartículas metálicas para la detección de contaminantes orgánicos persistentes mediante espectroscopía Raman intensificada por superficie*, 2008, Universidad Autónoma de Madrid.
46. Moskovits, M. and J.S. Suh, *Surface selection rules for surface-enhanced Raman spectroscopy: calculations and application to the surface-enhanced Raman spectrum of phthalazine on silver*. The Journal of Physical Chemistry, 1984. **88**(23): p. 5526-5530.
47. Creighton, J.A., *The effective Raman tensor for SER scattering by molecules adsorbed at the surface of a spherical particle*. Surface Science, 1985. **158**(1-3): p. 211-221.
48. Brolo, A.G., D.E. Irish, and B.D. Smith, *Applications of surface enhanced Raman scattering to the study of metal-adsorbate interactions*. Journal of Molecular Structure, 1997. **405**(1): p. 29-44.
49. Avila, F., et al., *How the electrode potential controls the selection rules of the charge transfer mechanism of SERS*. Chemical Communications, 2011. **47**(14): p. 4213-4215.
50. Jensen, L., C.M. Aikens, and G.C. Schatz, *Electronic structure methods for studying surface-enhanced Raman scattering*. Chemical Society Reviews, 2008. **37**(5): p. 1061-1073.
51. Otto, A., et al., *The "adatom model" of SERS (Surface Enhanced Raman Scattering): The present status*. Surface Science, 1984. **138**(2): p. 319-338.
52. Schütz, M., et al., *Hydrophilically stabilized gold nanostars as SERS labels for tissue imaging of the tumor suppressor p63 by immuno-SERS microscopy*. Chemical communications (Cambridge, England), 2011. **47**(14): p. 4216-4218.

53. El-Sayed, M.A., *Small Is Different: Shape-, Size-, and Composition-Dependent Properties of Some Colloidal Semiconductor Nanocrystals*. Accounts of Chemical Research, 2004. **37**(5): p. 326-333.
54. Anker, J.N., et al., *Biosensing with plasmonic nanosensors*. Nat Mater, 2008. **7**(6): p. 442-453.
55. Cui, Q., et al., *Preparation of gold nanostars and their study in selective catalytic reactions*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2015. **465**(0): p. 20-25.
56. Vo-Dinh, T., et al., *SERS Nanosensors and Nanoreporters: Golden Opportunities in Biomedical Applications*. Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology, 2015. **7**(1): p. 17-33.
57. Nguyen, A.H., X. Ma, and S.J. Sim, *Gold nanostar based biosensor detects epigenetic alterations on promoter of real cells*. Biosensors and Bioelectronics, 2015. **66**(0): p. 497-503.
58. Giannini, V., R. Rodriguez-Oliveros, and J.A. Sanchez-Gil, *Surface Plasmon Resonances of Metallic Nanostars/Nanoflowers for Surface-Enhanced Raman Scattering*. Plasmonics, 2010. **5**(1): p. 99-104.
59. Ma, W.Y., et al., *A numerical investigation of the effect of vertex geometry on localized surface plasmon resonance of nanostructures*. Optics Express, 2010. **18**(2): p. 843-853.
60. Pandian Senthil, K., et al., *High-yield synthesis and optical response of gold nanostars*. Nanotechnology, 2008. **19**(1): p. 015606.
61. Moula, G., et al., *Plasmonics and single-molecule detection in evaporated silver-island films*. Annalen der Physik, 2012. **524**(11): p. 697-704.
62. Haynes, C.L. and D. Van, *Nanosphere Lithography: A Versatile Nanofabrication Tool for Studies of Size-Dependent Nanoparticle Optics*. The journal of physical chemistry. B, 2001. **105**(24): p. 5599-5611.
63. Sánchez-Cortés, S., et al., *Morphological Study of Silver Colloids Employed in Surface-Enhanced Raman Spectroscopy: Activation when Exciting in Visible and Near-Infrared Regions*. Journal of Colloid and Interface Science, 1995. **175**(2): p. 358-368.
64. Sánchez-Cortés, S., J.V. García-Ramos, and G. Morcillo, *Morphological Study of Metal Colloids Employed as Substrate in the SERS Spectroscopy*. Journal of Colloid and Interface Science, 1994. **167**(2): p. 428-436.
65. Luo, J., P. Wang, and Y. Fang, *Direct visual evidence for chemical mechanism of SERRS of pyrazine adsorbed on Ag nanoparticle via charge transfer*. Vibrational Spectroscopy, 2014. **70**: p. 162-167.
66. Roman-Perez, J., et al., *Huge Energy Gain in Metal-to-Molecule Charge Transfer Processes: A Combined Effect of an Electrical Capacitive Enhancement in Nanometer-Size Hot Spots and the Electronic Structure of the Surface Complex*. The Journal of Physical Chemistry C, 2014. **118**(5): p. 2718-2725.
67. Fayyaz, S., et al., *Surface-Enhanced Fluorescence: Mapping Individual Hot Spots in Silica-Protected 2D Gold Nanotriangle Arrays*. The Journal of Physical Chemistry C, 2012. **116**(21): p. 11665-11670.
68. Creighton, J.A., C.G. Blatchford, and M.G. Albrecht, *Plasma resonance enhancement of Raman scattering by pyridine adsorbed on silver or gold sol particles of size comparable to the excitation wavelength*. Journal of the

- Chemical Society, Faraday Transactions 2: Molecular and Chemical Physics, 1979. **75**(0): p. 790-798.
69. Kneipp, K., et al., *Single Molecule Detection Using Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS)*. Physical Review Letters, 1997. **78**(9): p. 1667-1670.
70. Willets, K.A. and R.P. Van Duyne, *Localized Surface Plasmon Resonance Spectroscopy and Sensing*. Annual Review of Physical Chemistry, 2007. **58**(1): p. 267-297.
71. Matteini, P., et al., *Concave gold nanocube assemblies as nanotraps for surface-enhanced Raman scattering-based detection of proteins*. Nanoscale, 2015. **7**(8): p. 3474-3480.
72. Lu, X., et al., *Chemical Synthesis of Novel Plasmonic Nanoparticles*. Annual Review of Physical Chemistry, 2009. **60**(1): p. 167-192.
73. Howes, B.D., et al., *The influence of pH and anions on the adsorption mechanism of rifampicin on silver colloids*. Journal of Raman Spectroscopy, 2007. **38**(7): p. 859-864.
74. Guerrini, L., et al., *Nanosensors Based on Viologen Functionalized Silver Nanoparticles: Few Molecules Surface-Enhanced Raman Spectroscopy Detection of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Interparticle Hot Spots*. Analytical Chemistry, 2009. **81**(4): p. 1418-1425.
75. Sajanalal, P.R., et al., *Anisotropic nanomaterials: structure, growth, assembly, and functions*. Nano Reviews, 2011. **2**: p. 10.3402/nano.v2i0.5883.
76. Prodan, E., et al., *A Hybridization Model for the Plasmon Response of Complex Nanostructures*. Science, 2003. **302**(5644): p. 419-422.
77. Ming, L., et al., *Shape-dependent surface-enhanced Raman scattering in gold–Raman-probe–silica sandwiched nanoparticles for biocompatible applications*. Nanotechnology, 2012. **23**(11): p. 115501.
78. Yuan, H., et al., *In vivo particle tracking and photothermal ablation using plasmon-resonant gold nanostars*. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 2012. **8**(8): p. 1355-1363.
79. Skrabalak, S.E., et al., *Gold Nanocages: Synthesis, Properties, and Applications*. Accounts of Chemical Research, 2008. **41**(12): p. 1587-1595.
80. Yuan, H., et al., *Spectral characterization and intracellular detection of Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS)-encoded plasmonic gold nanostars*. Journal of Raman Spectroscopy, 2013. **44**(2): p. 234-239.
81. Huff, T.B., et al., *Hyperthermic effects of gold nanorods on tumor cells*. Nanomedicine, 2007. **2**(1): p. 125-132.
82. Barbosa, S., et al., *Tuning Size and Sensing Properties in Colloidal Gold Nanostars*. Langmuir, 2010. **26**(18): p. 14943-14950.
83. Nehl, C.L., H. Liao, and J.H. Hafner, *Optical Properties of Star-Shaped Gold Nanoparticles*. Nano Letters, 2006. **6**(4): p. 683-688.
84. Nehl, C.L., H. Liao, and J.H. Hafner, *Plasmon resonant molecular sensing with single gold nanostars*. 2006.
85. Murphy, C.J., et al., *Anisotropic Metal Nanoparticles: Synthesis, Assembly, and Optical Applications*. The Journal of Physical Chemistry B, 2005. **109**(29): p. 13857-13870.

86. Guerrero-Martínez, A., et al., *Nanostars shine bright for you: Colloidal synthesis, properties and applications of branched metallic nanoparticles*. Current Opinion in Colloid & Interface Science, 2011. **16**(2): p. 118-127.
87. Hill, R.T., *Plasmonic biosensors*. Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology, 2015. **7**(2): p. 152-168.
88. Satija, J., et al., *Emerging use of nanostructure films containing capped gold nanoparticles in biosensors*. Nanotechnology, science and applications, 2010. **3**: p. 171-88.
89. Wang, S., et al., *Single Continuous Wave Laser Induced Photodynamic/Plasmonic Photothermal Therapy Using Photosensitizer-Functionalized Gold Nanostars*. Advanced Materials, 2013. **25**(22): p. 3055-3061.
90. Rodríguez-Lorenzo, L., et al., *Plasmonic nanosensors with inverse sensitivity by means of enzyme-guided crystal growth*. Nat Mater, 2012. **11**(7): p. 604-607.
91. Wang, Y., et al., *A Facile, Water-Based Synthesis of Highly Branched Nanostructures of Silver*. Langmuir, 2008. **24**(20): p. 12042-12046.
92. Sanchez-Gaytan, B.L., et al., *Spiky Gold Nanoshells: Synthesis and Enhanced Scattering Properties*. The Journal of Physical Chemistry C, 2012. **116**(18): p. 10318-10324.
93. Wu, H.-L., C.-H. Chen, and M.H. Huang, *Seed-Mediated Synthesis of Branched Gold Nanocrystals Derived from the Side Growth of Pentagonal Bipyramids and the Formation of Gold Nanostars*. Chemistry of Materials, 2009. **21**(1): p. 110-114.
94. Isaac, R.S.R., G. Sakthivel, and C. Murthy, *Green Synthesis of Gold and Silver Nanoparticles Using Averrhoa bilimbi Fruit Extract*. Journal of Nanotechnology, 2013. **2013**: p. 6.
95. Jegadeeswaran, P., R. Shivaraj, and R. Venckatesh, *GREEN SYNTHESIS OF SILVER NANOPARTICLES FROM EXTRACT OF PADINA TETRASTROMATICA LEAF*. Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures, 2012. **7**(3): p. 991-998.
96. Mahmoud, M.A., D. O'Neil, and M.A. El-Sayed, *Hollow and Solid Metallic Nanoparticles in Sensing and in Nanocatalysis*. Chemistry of Materials, 2014. **26**(1): p. 44-58.
97. Mahmoud, M.A., R. Narayanan, and M.A. El-Sayed, *Enhancing Colloidal Metallic Nanocatalysis: Sharp Edges and Corners for Solid Nanoparticles and Cage Effect for Hollow Ones*. Accounts of Chemical Research, 2013. **46**(8): p. 1795-1805.
98. Yin, J., et al., *Multipole plasmon resonances in self-assembled metal hollow-nanospheres*. Nanoscale, 2014. **6**(8): p. 3934-3940.
99. Pelaz, B., et al., *Interfacing Engineered Nanoparticles with Biological Systems: Anticipating Adverse Nano-Bio Interactions*. Small, 2013. **9**(9-10): p. 1573-1584.
100. Yuan, H., A.M. Fales, and T. Vo-Dinh, *TAT Peptide-Functionalized Gold Nanostars: Enhanced Intracellular Delivery and Efficient NIR Photothermal Therapy Using Ultralow Irradiance*. Journal of the American Chemical Society, 2012. **134**(28): p. 11358-11361.
101. Freddi, S., et al., *A Molecular Thermometer for Nanoparticles for Optical Hyperthermia*. Nano Letters, 2013. **13**(5): p. 2004-2010.

102. Xia, X., et al., *25th Anniversary Article: Galvanic Replacement: A Simple and Versatile Route to Hollow Nanostructures with Tunable and Well-Controlled Properties*. Advanced Materials, 2013. **25**(44): p. 6313-6333.
103. Meakin, P., *Formation of Fractal Clusters and Networks by Irreversible Diffusion-Limited Aggregation*. Physical Review Letters, 1983. **51**(13): p. 1119-1122.
104. Trefalt, G., F.J.M. Ruiz-Cabello, and M. Borkovec, *Interaction Forces, Heteroaggregation, and Deposition Involving Charged Colloidal Particles*. The Journal of Physical Chemistry B, 2014. **118**(23): p. 6346-6355.
105. Sánchez-Cortes, S., *SERS en coloides*, Instituto de Estructura de la Materia, CSIC. Serrano, 121. 28006-Madrid. España Opt. Pur. y Apl, 2004. **37**(2).
106. Derjaguin, B.V., *Theory of the stability of strongly charged lyophobic sols and the adhesion of strongly charged particles in solutions of electrolytes*. Acta Physicochim. USSR, 1941. **14**: p. 633-662.
107. Lyklema, J., *Principles of the stability of lyophobic colloidal dispersions in non-aqueous media*. Advances in Colloid and Interface Science, 1968. **2**(2): p. 67-114.
108. Verwey, E. and J.T.G. Overbeek, *Theory of the stability of lyophobic colloids*. Journal of Colloid Science, 1955. **10**(2): p. 224-225.
109. Overbeek, J.T.G., *Recent developments in the understanding of colloid stability*. Journal of Colloid and Interface Science, 1977. **58**(2): p. 408-422.
110. Schmitt, A., *Escalado temporal en agregación de partículas coloidales recubiertas con BSA*. Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio, 2000. **39**(4): p. 415-418.
111. Salicio, M.M.V. and M.D.M. Moreno, *Coloides e interfases* 2005: Ediciones Universidad de Salamanca.
112. Guerrini, L., et al., *Importance of Metal-Adsorbate Interactions for the Surface-enhanced Raman Scattering of Molecules Adsorbed on Plasmonic Nanoparticles*. Plasmonics, 2007. **2**(3): p. 147-156.
113. Langmuir, I., *THE CONSTITUTION AND FUNDAMENTAL PROPERTIES OF SOLIDS AND LIQUIDS. II. LIQUIDS. I*. Journal of the American Chemical Society, 1917. **39**(9): p. 1848-1906.
114. Brunauer, S., P.H. Emmett, and E. Teller, *Adsorption of Gases in Multimolecular Layers*. Journal of the American Chemical Society, 1938. **60**(2): p. 309-319.
115. Israelachvili, J.N., *11 - Contrasts between Intermolecular, Interparticle, and Intersurface Forces*, in *Intermolecular and Surface Forces (Third Edition)*, J.N. Israelachvili, Editor 2011, Academic Press: San Diego. p. 205-222.
116. Wu, Z., et al., *A simple and universal "turn-on" detection platform for proteases based on surface enhanced Raman scattering (SERS)*. Biosensors and Bioelectronics, 2015. **65**(0): p. 375-381.
117. Negri, P., et al., *Online SERS detection and characterization of eight biologically-active peptides separated by capillary zone electrophoresis*. Analyst, 2015. **140**(5): p. 1516-1522.
118. Kahraman, M. and S. Wachsmann-Hogiu, *Label-free and direct protein detection on 3D plasmonic nanovoid structures using surface-enhanced Raman scattering*. Analytica Chimica Acta, 2015. **856**(0): p. 74-81.

119. Vera, A.M., et al., *Interaction of the CLPFFD peptide with gold nanospheres. A Raman, surface enhanced Raman scattering and theoretical study*. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2015. **134**(0): p. 251-256.
120. Keskin, S., M. Kahraman, and M. Culha, *Differential separation of protein mixtures using convective assembly and label-free detection with surface enhanced Raman scattering*. Chemical Communications, 2011. **47**(12): p. 3424-3426.
121. Drescher, D. and J. Kneipp, *Nanomaterials in complex biological systems: insights from Raman spectroscopy*. Chemical Society Reviews, 2012. **41**(17): p. 5780-5799.
122. Cotton, T.M., J.-H. Kim, and G.D. Chumanov, *Application of surface-enhanced Raman spectroscopy to biological systems*. Journal of Raman Spectroscopy, 1991. **22**(12): p. 729-742.
123. Nabiev, I.R., R.G. Efremov, and G.D. Chumanov, *Surface-enhanced Raman scattering and its application to the study of biological molecules*. Soviet Physics Uspekhi, 1988. **31**(3): p. 241.
124. Nabiev, I.R., G.D. Chumanov, and R.G. Efremov, *Surface-enhanced Raman spectroscopy of biomolecules. Part II. Application of short- and long-range components of SERS to the study of the structure and function of membrane proteins*. Journal of Raman Spectroscopy, 1990. **21**(1): p. 49-53.
125. Grunze, M., *Spectroscopy of surfaces*. Edited by R. J. H. Clark and R. E. Hester. Wiley, Chichester 1988. xxi, 488 pp., bound US \$190. - ISBN 0-471 -91 895-4. Advanced Materials, 1989. **1**(7): p. 241-241.
126. Chumanov, G.D., R.G. Efremov, and I.R. Nabiev, *Surface-enhanced Raman spectroscopy of biomolecules. Part I.—water-soluble proteins, dipeptides and amino acids*. Journal of Raman Spectroscopy, 1990. **21**(1): p. 43-48.
127. Qian, X., et al., *In vivo tumor targeting and spectroscopic detection with surface-enhanced Raman nanoparticle tags*. Nat Biotech, 2008. **26**(1): p. 83-90.
128. Krafft, C. and V. Sergo, *Biomedical applications of Raman and infrared spectroscopy to diagnose tissues*. Spectroscopy, 2006. **20**(5-6).
129. Alvarez-Puebla, R.A. and L.M. Liz-Marzán, *SERS-Based Diagnosis and Biodetection*. Small, 2010. **6**(5): p. 604-610.
130. Guarrotxena, N. and G.C. Bazan, *Antitags: SERS-Encoded Nanoparticle Assemblies that Enable Single-Spot Multiplex Protein Detection*. Advanced Materials, 2014. **26**(12): p. 1941-1946.
131. Boisselier, E. and D. Astruc, *Gold nanoparticles in nanomedicine: preparations, imaging, diagnostics, therapies and toxicity*. Chemical Society Reviews, 2009. **38**(6): p. 1759-1782.
132. Xia, Y., et al., *Gold Nanocages: From Synthesis to Theranostic Applications*. Accounts of Chemical Research, 2011. **44**(10): p. 914-924.
133. Dondapati, S.K., et al., *Label-free Biosensing Based on Single Gold Nanostars as Plasmonic Transducers*. ACS Nano, 2010. **4**(11): p. 6318-6322.
134. Jana, D., et al., *Capping Agent-Free Gold Nanostars Show Greatly Increased Versatility and Sensitivity for Biosensing*. Analytical Chemistry, 2015. **87**(7): p. 3964-3972.

135. Bancroft, J.D. and M. Gamble, *Theory and Practice of Histological Techniques* 2008: Churchill Livingstone.
136. Horobin, R.W. and J.A. Kiernan, *Conn's Biological Stains: A Handbook of Dyes, Stains and Fluorochromes for Use in Biology and Medicine* 2002: BIOS.
137. Frid, P., S.V. Anisimov, and N. Popovic, *Congo red and protein aggregation in neurodegenerative diseases*. Brain Research Reviews, 2007. **53**(1): p. 135-160.
138. Hawe, A., M. Sutter, and W. Jiskoot, *Extrinsic Fluorescent Dyes as Tools for Protein Characterization*. Pharmaceutical Research, 2008. **25**(7): p. 1487-1499.
139. Biancalana, M. and S. Koide, *Molecular Mechanism of Thioflavin-T Binding to Amyloid Fibrils*. Biochimica et biophysica acta, 2010. **1804**(7): p. 1405-1412.
140. Freire, S., et al., *Photophysical study of Thioflavin T as fluorescence marker of amyloid fibrils*. Dyes and Pigments, 2014. **110**: p. 97-105.
141. Nilsson, K.P.R., *Small organic probes as amyloid specific ligands – Past and recent molecular scaffolds*. FEBS Letters, 2009. **583**(16): p. 2593-2599.
142. Groenning, M., *Binding mode of Thioflavin T and other molecular probes in the context of amyloid fibrils—current status*. Journal of Chemical Biology, 2010. **3**(1): p. 1-18.
143. Eduardo Lopez-Tobar, M.A., Daniel Jancura, Maria Vega Cañamares, Adianez García-Leis, Diana Fedunova, Gabriela Fabriciova, and Santiago Sanchez-Cortes *Adsorption and Detection of Amyloid Marker Thioflavin T on Ag Nanoparticles by Surface-Enhanced Raman Scattering*. Journal of Physical Chemistry C, 2013. **117**(8): p. 10.
144. Groenning, M., et al., *Study on the binding of Thioflavin T to β -sheet-rich and non- β -sheet cavities*. Journal of Structural Biology, 2007. **158**(3): p. 358-369.
145. Chalabi, M., et al., *Somatostatin analogs: does pharmacology impact antitumor efficacy?* Trends in Endocrinology & Metabolism, 2014. **25**(3): p. 115-127.
146. Petersenn, S., et al., *Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, and Safety of Pasireotide LAR in Patients With Acromegaly: A Randomized, Multicenter, Open-Label, Phase I Study*. Journal of Clinical Pharmacology, 2014. **54**(11): p. 1308-1317.
147. Valéry, C., et al., *Biomimetic organization: Octapeptide self-assembly into nanotubes of viral capsid-like dimension*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2003. **100**(18): p. 10258-10262.
148. Zheng, N., et al., *A Novel Lanreotide-Encoded Micelle System Targets Paclitaxel to the Tumors with Overexpression of Somatostatin Receptors*. Molecular Pharmaceutics, 2012. **9**(5): p. 1175-1188.
149. Valéry, C., et al., *Self-Association Process of a Peptide in Solution: From β -Sheet Filaments to Large Embedded Nanotubes*. Biophysical Journal, 2004. **86**(4): p. 2484-2501.
150. Gobeaux, F., et al., *Directing peptide crystallization through curvature control of nanotubes*. Journal of Peptide Science, 2014. **20**(7): p. 508-516.
151. Valery, C., F. Artzner, and M. Paternostre, *Peptide nanotubes: molecular organisations, self-assembly mechanisms and applications*. Soft Matter, 2011. **7**(20): p. 9583-9594.
152. Cherif-Cheikh, R., et al. *Autogel registered trade mark: a new lanreotide prolonged release formulation*. in *Proceed. Intern. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* 1998.

153. Schmid, H.A., *Pasireotide (SOM230): Development, mechanism of action and potential applications*. Molecular and Cellular Endocrinology, 2008. **286**(1–2): p. 69-74.
154. Ben-Shlomo, A., *Pharmacotherapy for Acromegaly Future Role for Pasireotide?* Endocrinology and Metabolism Clinics of North America, 2015. **44**(1): p. 35-+.
155. Colao, A., et al., *Pasireotide Versus Octreotide in Acromegaly: A Head-to-Head Superiority Study*. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2014. **99**(3): p. 791-799.
156. Kamal, A., N. Shankaraiah, and S. Nekkanti, *Recent Horizons in Drug Discovery and Development*.
157. Arimon, M., et al., *Template-Assisted Lateral Growth of Amyloid- β 42 Fibrils Studied by Differential Labeling with Gold Nanoparticles*. Bioconjugate Chemistry, 2012. **23**(1): p. 27-32.
158. Yang, M. and D.B. Teplow, *Amyloid β -protein monomer folding: free energy surfaces reveal alloform specific differences*. Journal of molecular biology, 2008. **384**(2): p. 450-464.
159. Serpell, L.C., C.C.F. Blake, and P.E. Fraser, *Molecular Structure of a Fibrillar Alzheimer's A β Fragment†*. Biochemistry, 2000. **39**(43): p. 13269-13275.
160. Barrow, C. and M. Zagorski, *Solution structures of beta peptide and its constituent fragments: relation to amyloid deposition*. Science, 1991. **253**(5016): p. 179-182.
161. Serpell, L.C., *Alzheimer's amyloid fibrils: structure and assembly*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease, 2000. **1502**(1): p. 16-30.
162. Tomaselli, S., et al., *The alpha-to-beta conformational transition of Alzheimer's A β -(1-42) peptide in aqueous media is reversible: a step by step conformational analysis suggests the location of beta conformation seeding*. Chembiochem, 2006. **7**(2): p. 257-67.
163. Vivekanandan, S., et al., *A partially folded structure of amyloid-beta(1-40) in an aqueous environment*. Biochem Biophys Res Commun, 2011. **411**(2): p. 312-6.
164. Kohno, T., et al., *Three-dimensional structures of the amyloid beta peptide (25-35) in membrane-mimicking environment*. Biochemistry, 1996. **35**(50): p. 16094-104.
165. Sublimi Saponetti, M., et al., *Aggregation of A β (25-35) on DOPC and DOPC/DHA Bilayers: An Atomic Force Microscopy Study*. PLoS ONE, 2014. **9**(12): p. e115780.
166. Sendrowski, K., et al., *Study of the protective effects of nootropic agents against neuronal damage induced by amyloid-beta (fragment 25–35) in cultured hippocampal neurons*. Pharmacological Reports, 2015. **67**(2): p. 326-331.
167. Gray, C.W. and A.J. Patel, *Neurodegeneration mediated by glutamate and β -amyloid peptide: a comparison and possible interaction*. Brain Research, 1995. **691**(1–2): p. 169-179.
168. Millucci, L., et al., *Rapid aggregation and assembly in aqueous solution of A β (25–35) peptide*. Journal of Biosciences, 2009. **34**(2): p. 293-303.
169. Kubo, T., et al., *In vivo conversion of racemized β -amyloid ([D-Ser26]A β 1–40) to truncated and toxic fragments ([D-Ser26]A β 25–35/40) and fragment*

- presence in the brains of Alzheimer's patients*. Journal of Neuroscience Research, 2002. **70**(3): p. 474-483.
170. Clementi, M.E., et al., *Abeta(31-35) and Abeta(25-35) fragments of amyloid beta-protein induce cellular death through apoptotic signals: Role of the redox state of methionine-35*. FEBS Lett, 2005. **579**(13): p. 2913-8.
 171. Clementi, M.E. and F. Misiti, *Substitution of methionine 35 inhibits apoptotic effects of Abeta (31-35) and Abeta (25-35) fragments of amyloid-beta protein in PC12 cells*. Annals of Transplantation, 2005. **11**(11): p. BR381-BR385.
 172. Peng, J., et al. *Interactions between gold nanoparticles and amyloid β 25-35 peptide*. IET Nanobiotechnology, 2014. **8**, 295-303.
 173. Sevilla, P., et al., *Concentration-Controlled Formation of Myoglobin/Gold Nanosphere Aggregates*. The Journal of Physical Chemistry B, 2014. **118**(19): p. 5082-5092.
 174. Bell, S.E.J. and N.M.S. Sirimuthu, *Surface-Enhanced Raman Spectroscopy (SERS) for Sub-Micromolar Detection of DNA/RNA Mononucleotides*. Journal of the American Chemical Society, 2006. **128**(49): p. 15580-15581.
 175. Sanchez Gaytan, B., et al., *Spiky Gold Nanoshells: Synthesis and Enhanced Scattering Properties*. The journal of physical chemistry. C, 2012. **116**(18): p. 10318-10324.
 176. Vigderman, L., E. Vigderman, and Zubarev, *Starfruit-Shaped Gold Nanorods and Nanowires: Synthesis and SERS Characterization*. Langmuir, 2012. **28**(24): p. 9034-9040.
 177. Giorgetti, E., et al., *Tunable gold nanostars for surface enhanced Raman spectroscopy*. physica status solidi (b), 2012. **249**(6): p. 1188-1192.
 178. Wu, H.-L., C.-H. Chen, and M.H. Huang, *Seed-Mediated Synthesis of Branched Gold Nanocrystals Derived from the Side Growth of Pentagonal Bipyramids and the Formation of Gold Nanostars*. Chemistry of Materials, 2008. **21**(1): p. 110-114.
 179. Mahmoud, M.A., D. O'Neil, and M.A. El-Sayed, *Hollow and Solid Metallic Nanoparticles in Sensing and in Nanocatalysis*. Chemistry of Materials, 2014. **26**(1): p. 44-58.
 180. Yang, Y., et al., *Transformation of Ag Nanocubes into Ag–Au Hollow Nanostructures with Enriched Ag Contents to Improve SERS Activity and Chemical Stability*. ACS Applied Materials & Interfaces, 2014. **6**(5): p. 3750-3757.
 181. Slater, T.J.A., et al., *Correlating Catalytic Activity of Ag–Au Nanoparticles with 3D Compositional Variations*. Nano Letters, 2014. **14**(4): p. 1921-1926.
 182. Yang, J., J.Y. Lee, and H.-P. Too, *Core–Shell Ag–Au Nanoparticles from Replacement Reaction in Organic Medium*. The Journal of Physical Chemistry B, 2005. **109**(41): p. 19208-19212.
 183. da Silva, A.G.M., et al., *Rapid Synthesis of Hollow Ag–Au Nanodendrites in 15 Seconds by Combining Galvanic Replacement and Precursor Reduction Reactions*. Chemistry – A European Journal, 2014. **20**(46): p. 15040-15046.
 184. Pfeiffer, C., et al., *Interaction of colloidal nanoparticles with their local environment: the (ionic) nanoenvironment around nanoparticles is different from bulk and determines the physico-chemical properties of the nanoparticles*. Vol. 11. 2014.

185. Frens, G., *Controlled Nucleation for the Regulation of the Particle Size in Monodisperse Gold Suspensions*. nature physical science, 1973. **241**: p. 20-22.
186. López-Tobar, E., et al., *Stability of the Disulfide Bond in Cystine Adsorbed on Silver and Gold Nanoparticles As Evidenced by SERS Data*. The Journal of Physical Chemistry C, 2013. **117**(3): p. 1531-1537.
187. SR6, O.G., *OriginPro 7.5G SR6*, 1991-2006, OringingLab Corporation
188. Wayne Rasband, T.F., Wilhelm Burger, Gilles Carpentier, , *ImageJ*, IJ 1.47v, 2013: <http://imagej.nih.gov>.
189. Verebes, G.S., et al., *Hyperspectral enhanced dark field microscopy for imaging blood cells*. J Biophotonics, 2013. **6**(11-12): p. 960-7.
190. Guajardo-Flores, D., S.O. Serna-Saldívar, and J.A. Gutiérrez-Urbe, *Evaluation of the antioxidant and antiproliferative activities of extracted saponins and flavonols from germinated black beans (Phaseolus vulgaris L.)*. Food Chemistry, 2013. **141**(2): p. 1497-1503.
191. Massenssini, A.M., et al., *Relative importance of soil physico-chemical characteristics and plant species identity to the determination of soil microbial community structure*. Applied Soil Ecology, 2015. **91**(0): p. 8-15.
192. Szydłowska-Czerniak, A. and A. Tułodziecka, *Comparison of a silver nanoparticle-based method and the modified spectrophotometric methods for assessing antioxidant capacity of rapeseed varieties*. Food Chemistry, 2013. **141**(3): p. 1865-1871.
193. Process AS, C., *The Unscrambler X*, 2009, CAMO Software AS. All rights reserved.: <http://www.camo.com>.
194. Bell, S.E.J. and N.M.S. Sirimuthu, *Quantitative surface-enhanced Raman spectroscopy*. Chemical Society Reviews, 2008. **37**(5): p. 1012-1024.
195. Harris, D.C., *Análisis Químico Cuantitativo*. 2009. 6ª edición. Tema 12. Reverté.
196. Daniel, H., *Analisis quimico cuantitativo*. 3rd ed2006, Barcelona.
197. Izquierdo-Lorenzo, I., et al., *Adsorption and Detection of Sport Doping Drugs on Metallic Plasmonic Nanoparticles of Different Morphology*. Langmuir, 2012. **28**(24): p. 8891-8901.
198. Lee, P.C. and D. Meisel, *ADSORPTION AND SURFACE-ENHANCED RAMAN OF DYES ON SILVER AND GOLD SOLS*. Journal of Physical Chemistry, 1982. **86**(17): p. 3391-3395.
199. Leopold, N. and B. Lendl, *A New Method for Fast Preparation of Highly Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) Active Silver Colloids at Room Temperature by Reduction of Silver Nitrate with Hydroxylamine Hydrochloride*. The Journal of Physical Chemistry B, 2003. **107**(24): p. 5723-5727.
200. Mie, G., *Beiträge zur Optik trüber Medien, speziell kolloidaler Metallösungen*. Annalen der Physik, 1908. **330**(3): p. 377-445.
201. Garcia-Leis, A., J.V. Garcia-Ramos, and S. Sanchez-Cortes, *Silver Nanostars with High SERS Performance*. Journal of Physical Chemistry C, 2013. **117**(15): p. 7791-7795.
202. Gatemala, H., C. Thammacharoen, and S. Ekgasit, *3D AgCl microstructures selectively fabricated via Cl--induced precipitation from [Ag(NH3)2]+*. CrystEngComm, 2014. **16**(29): p. 6688-6696.

203. Mettela, G., et al., *Nanocrystalline Ag microflowers as a versatile SERS platform*. *Nanoscale*, 2014. **6**(13): p. 7480-7488.
204. Cheng, L., et al., *Hierarchical silver mesoparticles with tunable surface topographies for highly sensitive surface-enhanced Raman spectroscopy*. *Journal of Materials Chemistry A*, 2014. **2**(13): p. 4534-4542.
205. Dimitrijevic, R., et al., *SEM/EDX AND XRD CHARACTERIZATION OF SILVER NANOCRYSTALLINE THIN FILM PREPARED FROM ORGANOMETALLIC SOLUTION PRECURSOR*. *Journal of Mining and Metallurgy Section B-Metallurgy*, 2013. **49**(1): p. 91-95.
206. Carron, K.T. and L.G. Hurley, *Axial and azimuthal angle determination with surface-enhanced Raman spectroscopy: thiophenol on copper, silver, and gold metal surfaces*. *The Journal of Physical Chemistry*, 1991. **95**(24): p. 9979-9984.
207. Guerrini, L., et al., *Ultrathin silver-coated gold nanoparticles as suitable substrate for surface-enhanced Raman scattering*. *Journal of Raman Spectroscopy*, 2010. **41**(5): p. 508-515.
208. López Tocón, J.S., *Estados superficiales nanocluster-adsorbato*. *Optica pura y aplicada*, 2004. **37**(2): p. 53-64.
209. Varsanyi, G., *Vibrational Spectra of Benzene Derivatives* 2012: Elsevier Science.
210. Kim, S.K., M.S. Kim, and S.W. Suh, *Surface-enhanced Raman scattering (SERS) of aromatic amino acids and their glycyl dipeptides in silver sol*. *Journal of Raman Spectroscopy*, 1987. **18**(3): p. 171-175.
211. Sánchez-Cortés, S. and J.V. García-Ramos, *Influence of coverage in the surface-enhanced Raman scattering of cytosine and its methyl derivatives on metal colloids: chloride and pH effects*. *Surface Science*, 2001. **473**(1-2): p. 133-142.
212. Mayoral, A., et al., *On the structure of stellated single crystal Au/Ag nanoparticles*. *CrystEngComm*, 2010. **12**(4): p. 1090-1095.
213. Nelson, R. and D. Eisenberg, *Recent atomic models of amyloid fibril structure*. *Current Opinion in Structural Biology*, 2006. **16**(2): p. 260-265.
214. Eisenberg, D. and M. Jucker, *The Amyloid State of Proteins in Human Diseases*. *Cell*, 2012. **148**(6): p. 1188-1203.
215. Guo, H.B., et al., *Donepezil improves learning and memory deficits in APP/PS1 mice by inhibition of microglial activation*. *Neuroscience*, 2015. **290**(0): p. 530-542.
216. LeVine, H., *Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer's disease beta-amyloid peptides: detection of amyloid aggregation in solution*. *Protein Science : A Publication of the Protein Society*, 1993. **2**(3): p. 404-410.
217. Tjernberg, L.O., et al., *Controlling Amyloid β -Peptide Fibril Formation with Protease-stable Ligands*. *Journal of Biological Chemistry*, 1997. **272**(19): p. 12601-12605.
218. Ma, Q., G. Wei, and X. Yang, *Influence of Au nanoparticles on the aggregation of amyloid-[small beta]-(25-35) peptides*. *Nanoscale*, 2013. **5**(21): p. 10397-10403.
219. Han, S.-H., et al., *Effective screen for amyloid β aggregation inhibitor using amyloid β -conjugated gold nanoparticles*. *International Journal of Nanomedicine*, 2011. **6**: p. 1-12.

220. Krysmann, M., V. Castelletto, and I.W. Hamley, *Fibrillisation of hydrophobically modified amyloid peptide fragments in an organic solvent*. Soft Matter, 2007. **3**(11): p. 1401-1406.
221. PUCHTLER, H., F. SWEAT, and M. LEVINE, *ON THE BINDING OF CONGO RED BY AMYLOID*. Journal of Histochemistry & Cytochemistry, 1962. **10**(3): p. 355-364.
222. Krebs, M.R.H., E.H.C. Bromley, and A.M. Donald, *The binding of thioflavin-T to amyloid fibrils: localisation and implications*. Journal of Structural Biology, 2005. **149**(1): p. 30-37.
223. Ban, T., et al., *Direct Observation of Amyloid Fibril Growth Monitored by Thioflavin T Fluorescence*. Journal of Biological Chemistry, 2003. **278**(19): p. 16462-16465.
224. Eduardo Lopez-Tobar, M.A., Daniel Jancura , Maria Vega Cañamares, Adianez García-Leis, Diana Fedunova, Gabriela Fabriciova, and Santiago Sanchez-Cortes *Adsorption and Detection of Amyloid Marker Thioflavin T on Ag Nanoparticles by Surface-Enhanced Raman Scattering*. J. Phys. Chem. C, 2013. **117**(8): p. 10.
225. Sanchez-Cortes, S., et al., *Morphological-Study of Silver Colloids Employed in Surface-Enhanced Raman-Spectroscopy - Activation When Exciting in Visible and near-Infrared Regions*. Journal of Colloid and Interface Science, 1995. **175**(2): p. 358-368.
226. Lin, H., et al., *[Determination of congo red in beef by high performance liquid chromatography-tandem quadrupole time of flight mass spectrometry and ultra-high performance liquid chromatography-tandem triple quadrupole mass spectrometry]*. Se Pu, 2013. **31**(9): p. 914-9.
227. Sahraei, R., et al., *Spectrophotometry determination of Congo red in river water samples using nanosilver*. Toxicological & Environmental Chemistry, 2012. **94**(10): p. 1886-1892.
228. Al-Degs, Y.S. and J.A. Sweileh, *Simultaneous determination of five commercial cationic dyes in stream waters using diatomite solid-phase extractant and multivariate calibration*. Arabian Journal of Chemistry, 2012. **5**(2): p. 219-224.
229. Francioso, A., et al., *β -Sheet interfering molecules acting against β -amyloid aggregation and fibrillogenesis*. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2015. **23**(8): p. 1671-1683.
230. G., F., *Controlled nucleation for the regulation of the Particle size_NatPhysScien1973*. Nature Physical Science, 1973. **241**.
231. Calzolari, L., et al., *Protein-Nanoparticle Interaction: Identification of the Ubiquitin-Gold Nanoparticle Interaction Site*. Nano Letters, 2010. **10**(8): p. 3101-3105.
232. López-Tobar, E., et al., *Anchoring Sites of Fibrillogenic Peptide Hormone Somatostatin-14 on Plasmonic Nanoparticles*. The Journal of Physical Chemistry C, 2015. **119**(15): p. 8273-8279.
233. Lin, M.Y., et al., *Universality in colloid aggregation*. Nature, 1989. **339**(6223): p. 360-362.
234. Guerrini, L., et al., *Self-assembly of [small alpha],[small omega]-aliphatic diamines on Ag nanoparticles as an effective localized surface plasmon nanosensor based in interparticle hot spots*. Physical Chemistry Chemical Physics, 2009. **11**(34): p. 7363-7371.

235. Izquierdo-Lorenzo, I., et al., *Linking Ag Nanoparticles by Aliphatic α,ω -Dithiols: A Study of the Aggregation and Formation of Interparticle Hot Spots*. The Journal of Physical Chemistry C, 2013. **117**(31): p. 16203-16212.
236. Information., N.C.f.B. *PubChem Compound Database*; CID=71349, . accessed Aug. 20, 2015]; Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/71349>
237. Millam, R.D.a.T.K.a.J., *GaussView, Version 5*, 2009, Semichem Inc. Shawnee Mission KS 2009; Semichem Inc. Shawnee Mission KS 2009.
238. Molina-Trinidad, E.M., et al., *Electronic and vibrational spectra of novel Lanreotide peptide capped gold nanoparticles*. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2011. **82**(1): p. 283-289.
239. Stenn, K. and G.F. Bahr, *Specimen damage caused by the beam of the transmission electron microscope, a correlative reconsideration*. Journal of Ultrastructure Research, 1970. **31**(5-6): p. 526-550.
240. Baker, L.A. and J.L. Rubinstein, *Chapter Fifteen - Radiation Damage in Electron Cryomicroscopy*, in *Methods in Enzymology*, J.J. Grant, Editor 2010, Academic Press. p. 371-388.
241. Egerton, R.F., P. Li, and M. Malac, *Radiation damage in the TEM and SEM*. Micron, 2004. **35**(6): p. 399-409.
242. Hernández, B., et al., *Low concentration structural dynamics of lanreotide and somatostatin-14*. Biopolymers, 2014. **101**(10): p. 1019-1028.
243. Pandit, A., et al., *Self-assembly of the octapeptide lanreotide and lanreotide-based derivatives: the role of the aromatic residues*. Journal of Peptide Science, 2008. **14**(1): p. 66-75.
244. Garrido, C., et al., *Interaction of the C-terminal peptide from pigeon cytochrome C with silver nanoparticles. A Raman, SERS and theoretical study*. Vibrational Spectroscopy, 2012. **61**: p. 94-98.
245. Gobeaux, F., et al., *Experimental Observation of Double-Walled Peptide Nanotubes and Monodispersity Modeling of the Number of Walls*. Langmuir, 2013. **29**(8): p. 2739-2745.
246. Murvai, Ü., et al., *Structural and nanomechanical comparison of epitaxially and solution-grown amyloid β 25-35 fibrils*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics, 2015. **1854**(5): p. 327-332.
247. Meredith, S.C., *Protein denaturation and aggregation: Cellular responses to denatured and aggregated proteins*. Ann N Y Acad Sci, 2005. **1066**: p. 181-221.
248. Miura, T., H. Takeuchi, and I. Harada, *Characterization of individual tryptophan side chains in proteins using Raman spectroscopy and hydrogen-deuterium exchange kinetics*. Biochemistry, 1988. **27**(1): p. 88-94.
249. Hernández, B., et al., *Vibrational Analysis of Amino Acids and Short Peptides in Hydrated Media. VIII. Amino Acids with Aromatic Side Chains: l-Phenylalanine, l-Tyrosine, and l-Tryptophan*. The Journal of Physical Chemistry B, 2010. **114**(46): p. 15319-15330.
250. Ruggeri, F.S., et al., *Influence of the β -Sheet Content on the Mechanical Properties of Aggregates during Amyloid Fibrillization*. Angewandte Chemie International Edition, 2015. **54**(8): p. 2462-2466.

251. Voiciuk, V., et al., *Surface-enhanced Raman spectroscopy for detection of toxic amyloid β oligomers adsorbed on self-assembled monolayers*. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2012. **95**(0): p. 526-532.
252. Brorsson, A.-C., et al., *Intrinsic Determinants of Neurotoxic Aggregate Formation by the Amyloid β Peptide*. Biophysical Journal, 2010. **98**(8): p. 1677-1684.
253. Varadarajan, S., et al., *Review: Alzheimer's Amyloid β -Peptide-Associated Free Radical Oxidative Stress and Neurotoxicity*. Journal of Structural Biology, 2000. **130**(2-3): p. 184-208.
254. Castro, J.C.A. and n.S.C. Beltr'çn, *Surface Plasmon Resonance of a Few Particles Linear Arrays*. Journal of Electromagnetic Analysis and Applications, 2011. **Vol.03No.11**: p. 7.
255. Guillon, M., *Field enhancement in a chain of optically bound dipoles*. Optics Express, 2006. **14**(7): p. 3045-3055.
256. Nordlander, P., et al., *Plasmon Hybridization in Nanoparticle Dimers*. Nano Letters, 2004. **4**(5): p. 899-903.
257. Xu, H., et al., *Electromagnetic contributions to single-molecule sensitivity in surface-enhanced Raman scattering*. Physical Review E, 2000. **62**(3): p. 4318-4324.
258. Aliaga, A.E., et al., *Surface enhanced Raman scattering study of l-lysine*. Vibrational Spectroscopy, 2009. **50**(1): p. 131-135.
259. Podstawka, E., P. Kafarski, and L.M. Proniewicz, *Structural Properties of l-X-l-Met-l-Ala Phosphonate Tripeptides: A Combined FT-IR, FT-RS, and SERS Spectroscopy Studies and DFT Calculations*. The Journal of Physical Chemistry A, 2008. **112**(46): p. 11744-11755.
260. Li-Chan, E., S. Nakai, and M. Hirotsuka, *Raman spectroscopy as a probe of protein structure in food systems*, in *Protein Structure-Function Relationships in Foods*, R.Y. Yada, R.L. Jackman, and J.L. Smith, Editors. 1994, Springer US. p. 163-197.
261. Socrates, G., *Infrared and Raman characteristic group frequencies: tables and charts*2004: John Wiley & Sons.
262. Nogami, N., H. Sugeta, and T. Miyazawa, *Stretching Vibrations and Molecular Conformations of Isobutyl Methyl Sulfide and Related Alkyl Sulfides*. Bulletin of the Chemical Society of Japan, 1975. **48**(9): p. 2417-2420.
263. Graff, M. and J. Bukowska, *Surface-enhanced Raman scattering (SERS) spectroscopy of enantiomeric and racemic methionine on a silver electrode-evidence for chiral discrimination in interactions between adsorbed molecules*. Chemical Physics Letters, 2011. **509**(1-3): p. 58-61.
264. Hernández, B., et al., *Octreotide Used for Probing the Type-II' β -Turn CD and Raman Markers*. The Journal of Physical Chemistry B, 2012. **116**(31): p. 9337-9345.
265. Kaur, H. and G.P.S. Raghava, *A neural network method for prediction of β -turn types in proteins using evolutionary information*. Bioinformatics, 2004. **20**(16): p. 2751-2758.
266. Sawaya, M.R., et al., *Atomic structures of amyloid cross-[bgr] spines reveal varied steric zippers*. Nature, 2007. **447**(7143): p. 453-457.

267. Shanmugam, G. and P.L. Polavarapu, *Structure of A β (25–35) Peptide in Different Environments*. Biophysical Journal, 2004. **87**(1): p. 622-630.
268. Kajava, A.V., U. Baxa, and A.C. Steven, *β arcades: recurring motifs in naturally occurring and disease-related amyloid fibrils*. The FASEB Journal, 2010. **24**(5): p. 1311-1319.
269. D'Ursi, A.M., et al., *Solution Structure of Amyloid β -Peptide (25–35) in Different Media*. Journal of Medicinal Chemistry, 2004. **47**(17): p. 4231-4238.
270. Takeuchi, H., *UV Raman markers for structural analysis of aromatic side chains in proteins*. Analytical Sciences, 2011. **27**(11): p. 1077.
271. Blum, C., et al., *Understanding tip-enhanced Raman spectra of biological molecules: a combined Raman, SERS and TERS study*. Journal of Raman Spectroscopy, 2012. **43**(12): p. 1895-1904.
272. Paulite, M., et al., *Full Spectroscopic Tip-Enhanced Raman Imaging of Single Nanotapes Formed from β -Amyloid(1–40) Peptide Fragments*. ACS Nano, 2013. **7**(2): p. 911-920.
273. Kelly, K.L., et al., *The Optical Properties of Metal Nanoparticles: The Influence of Size, Shape, and Dielectric Environment*. The Journal of Physical Chemistry B, 2003. **107**(3): p. 668-677.
274. Movasaghi, Z., S. Rehman, and I.U. Rehman, *Raman Spectroscopy of Biological Tissues*. Applied Spectroscopy Reviews, 2007. **42**(5): p. 493-541.
275. Shiohara, A., et al., *Plasmon Modes and Hot Spots in Gold Nanostar–Satellite Clusters*. The Journal of Physical Chemistry C, 2015. **119**(20): p. 10836-10843.
276. Garcia-Leis, A., et al., *Hollow Au/Ag nanostars displaying broad plasmonic resonance and high surface-enhanced Raman sensitivity*. Nanoscale, 2015. **7**(32): p. 13629-13637.

8. Summary

Surface Enhanced Raman Spectroscopy (SERS) of biomolecules using ultrasensible plasmonic metal nanoparticles

SUMMARY

Surface-enhanced Raman scattering (SERS) is a powerful technique that provides valuable structural information from minute amounts of molecular analytes. This makes of SERS an outstanding tool for sensing applications. SERS relies on the special optical properties of plasmonic metal nanoparticles (NP) based on the excitation of the corresponding localized surface plasmon resonances (LSPRs). This excitation leads to a great enhancement of the local electric near field around the surface of the nanoparticles. The resonance of the surface plasmon can be tuned by means of several parameters such as the size and shape of the nanoparticles [273], thus allowing the study of biological objects by using laser excitation at 785 nm [274]. This effect is the basis for attractive applications of these metallic substrates as theranostic platforms, since these substrates exhibit Plasmon resonances the near-infrared (NIR) region, that is the so-called “tissue therapeutic window” [99]. On the other hand,, anisotropic nanoparticles with sharp tips can provide significantly large near-field enhancements, as compared to spherical nanoparticles and are thus excellent SERS substrates, that make unnecessary their aggregation, in contrast to what occurs for spherical nanoparticles, regularly employed in SERS [32, 275].

The fibril formation of amyloidogenic proteins is believed to be associated with the development of many diseases, such as Parkinson’s, Huntington’s and Alzheimer's diseases. The elucidation of the structure and assembly mechanisms of these peptides

has been a challenge to understand and hopefully prevent these diseases [150]. The fibrilization process involves the transition of a certain amyloid protein from normally soluble forms to insoluble amyloid fibrils, which are then accumulated in the extracellular space of various tissues [218]. The utilization of nanoparticles for the treatment of protein aggregation diseases is an important application of these interesting substrates. Moreover, the use of plasmonic nanoparticles can afford additional structural information from peptide traces. The investigation of the conjugation of amyloid- β proteins with the surfaces of Au nanoparticles have attracted considerable attention [172], since gold is appropriated for biological applications because of its low toxicity and also because of its easy detection.

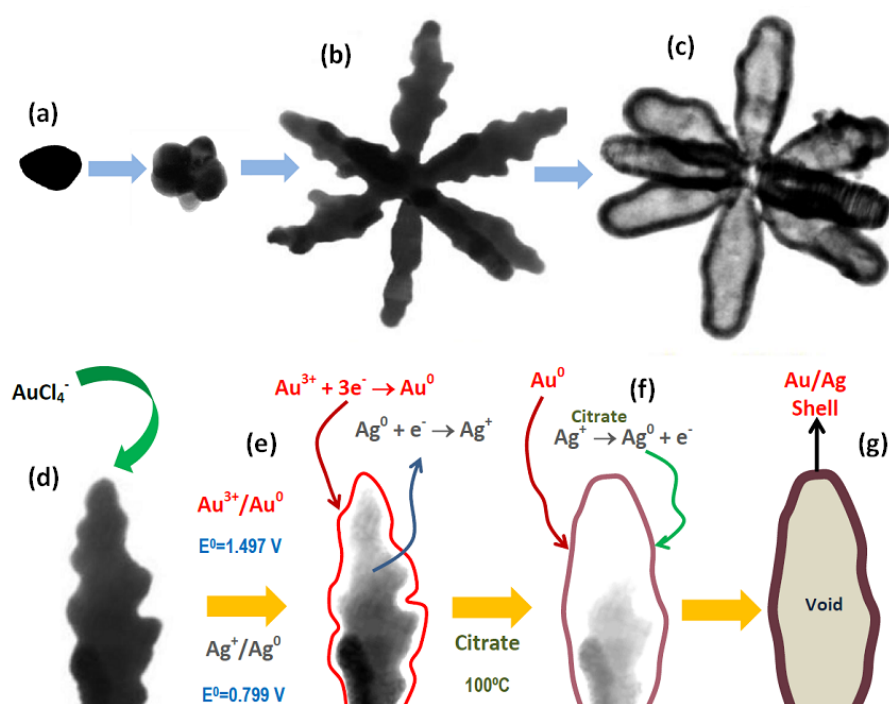


Figure 8.1: *Up:* (a–b) Schematic suggested process to explain the growing sequence of NSAg (silver nanostars) deduced from different Ag nanoparticles observed in Transmission Electron Microscopy (TEM) images, (c) TEM image of Ag/Au hollow nanostar obtain from Ag NS templates. *Bottom:* (d–g) reaction mechanisms suggested explaining the conversion of one NSAg arm into a hollow structure, by galvanic replacement and Ag redeposition induced by residual citrate.

We have developed in this Thesis a new strategy to fabricate nanoparticles with star shape (NS) by a simple method with high effectiveness in SERS and without the use of strong surfactants. In the present work were fabricated two kind of spiked nanoparticles (Figure 8.1): silver nanostars (NSAg) and hollow bimetallic (Ag/Au) nanostars

(HNSAgAu) were fabricated. The fabrication of hollow bimetallic NS, were obtained by method combining the classical chemical reduction and the galvanic replacement method, using the NSAg as template [143, 276]. This method avoids the use of other strong capping surfactants that may prevent the access of analytes to metallic surfaces, and their detection by SERS, even if the resulting AgNS and HNSAgAu were finally covered by citrate ions to increase their stability in suspension. Different experimental conditions were investigated to understand their effect on the morphology of resulting particles.

In this work special emphasis was devoted on the study of the interface composition and the nanoparticle morphology regarding the SERS response of molecules with high affinity to interact to plasmonic surfaces. This investigation was crucial to further optimize the nanoparticle characteristics for quantitative applications.

In order to accomplish the goals of the present Thesis a large list of instrumentation was employed: Raman and UV-visible spectrometers, TEM and SEM microscopy, EDX and dark-field microscopy.

In a direct approach, a methodology was developed for the identification and quantification of two groups of biomolecules, i) histological dyes with a high selectivity for amyloid fibrils responsible for the Alzheimer disease [137, 142, 143] and ii) fibrogenic peptides with a high capability to form different kind of fibrils and β -sheets aggregates in depending on the environmental conditions (Ilanreotide (LAN), pasireotide (SOM230) and some fragments of β -Amyloid peptide (β Am₂₅₋₃₅, β Am₁₋₄₀ and β Am₁₋₄₂)) [151, 155, 168].

The methodological approach included the analysis of the vibrational spectra, which involved a complete assignation of the corresponding Raman bands of the compounds in the solid state or aqueous solutions, and afterwards, the analysis of SERS spectra on different colloids. The SERS spectra afforded information about the interaction mechanism and the orientation of the substrate on the surface. Furthermore, the influence of metallic NPs on the aggregation of the studied peptides was investigated in this Thesis by means of the SERS technique and TEM microscopy (Figure 8.2).

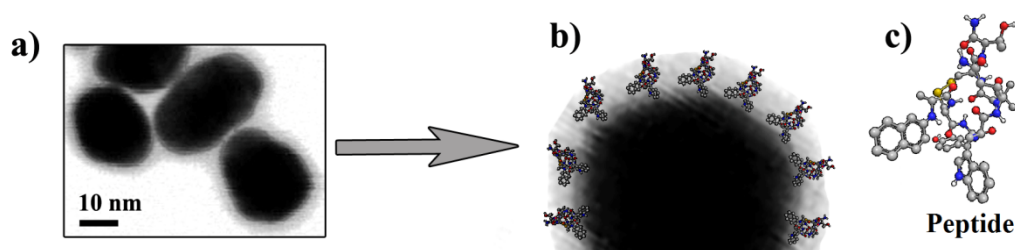


Figure 8.2: (a) TEM image of AuNP in presence of a lanreotide (1 μ M). (b) Zoomed image of a gold NP surrounded by a peptide layer (~7 nm of protein corona). (c) Scheme of LAN peptide structure obtain by GaussView 5.0 from a PubChem Compound Database file [236].

In a second step, the adsorption isotherms were obtained from the analysis of the SERS data and the adsorption parameters, i.e. the adsorption constant (K_{ad}), and the maximum registered intensity (I_{sm}) were calculated by plotting a characteristic marker band of the analyte against the biomolecule concentration in the colloid. The adsorption mechanism deduced from the adsorption of both histological dyes (ThT and CR) follow a Langmuir-like model, and the fibrogenic peptides follow a sigmoidal behaviour, due to the differences in the intermolecular interaction between adsorbate molecules and the metal surface. At low concentration, a linear behaviour allowed the linear fitting of calibration curves and the evaluation of the technique sensitivity and limit of detection for each biomolecule.

In conclusion, the fabrication methods reported in this Thesis give rise to nanoparticles of silver and hollow bimetallic (Ag/Au) star-shaped with good plasmonic properties to afford a large SERS intensification. These substrates were demonstrated to be high active regarding the SERS spectroscopy of the dyes most used for detection of amyloid fibrils (ThT and CR). However, they were not so active in the study of other biomolecules due to the negative influence of the already adsorbed citrate. This was the case of the fibrogenic peptides (LAN, SOM230 and β -Am), which were studied using silver and gold NP as SERS substrates for their vibrational characterization at low concentrations. In the particular case of peptides, the influence of metal NP on the peptide aggregation and the adsorption on the metal surface was also checked.

9. Publicaciones